

**Effekte der lektinartigen Domäne des Thrombomodulin in
der murinen polymikrobiellen septischen Kardiomyopathie**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Nadine Hechaichi
geboren am 20.02.1985 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Reinhard Bauer, Jena
2. Prof. Dr. med. Regine Heller, Jena
3. Prof. Dr. med. Sebastian Stehr, Lübeck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.07.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Sepsis	10
1.2 Sepsis-induzierte Kardiomyopathie.....	12
1.2.1 Mechanismen der septischen Kardiomyopathie	13
1.2.2 Forschungsansätze	18
1.3 Thrombomodulin und Sepsis.....	19
1.3.1 Struktur und Funktion von Thrombomodulin.....	20
1.3.2 Thrombomodulin und Herz	23
2 Ziele der Arbeit	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Mäuse.....	27
3.2 Experimentelle Sepsis.....	27
3.3 Überlebenszeitanalyse und Erhebung klinischer Krankheitsparameter.....	28
3.4 Euthanasie, Blut- und Organentnahme, Plasmagewinnung, Bestimmung klinisch relevanter Schädigungsparameter	28
3.5 Beurteilung der Herzfunktion mittels intrakardialer Konduktanzkatheter- Messung.....	29
3.6 Isolation primärer Kardiomyozytenkulturen.....	31
3.6.1 Neonatale Kardiomyozytenkulturen	31
3.6.2 Adulte Kardiomyozytenkulturen	32
3.7 <i>in vitro</i> Stimulationen	33
3.8 Etablierung eines geeigneten Protokolls zur <i>in vitro</i> cDNA/siRNA Transfektion.....	34
3.9 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	36
3.10 Proteinbiochemische/Immunbiologische Nachweismethoden	38
3.10.1 Zytokinbestimmung mittels <i>Cytometric Bead Array</i>	38
3.10.2 Quantitative Bestimmung von kardialem Troponin I und HMGB-1	38

3.10.3	SDS-PAGE und Western Blotting	39
3.11	Histologie/Immunhistochemie	40
3.11.1	Immunhistochemische Färbung und (Fluoreszenz-) Mikroskopie	40
3.11.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
3.11.3	TUNEL-Färbung	41
3.11.4	PMN-Färbung	42
3.12	Statistische Auswertung	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Einfluss der LED-TM auf das Überleben und die Schwere der Organschädigung nach polymikrobieller Sepsis	44
4.1.1	Überlebenszeitanalyse	44
4.1.2	<i>Clinical Severity Score</i>	45
4.1.3	Blutbild- und Organschädigungsparameter	46
4.2	Kontraktile Dysfunktion des Herzens nach Sepsis	49
4.3	Histopathologie des Herzens nach PCI	51
4.3.1	Morphologie und Apoptose	51
4.3.2	Infiltration des Herzens durch Immunzellen	52
4.4	Zirkulierende inflammatorische Proteine nach polymikrobieller Sepsis	55
4.5	Kardiale Inflamationsreaktion nach polymikrobieller Sepsis	57
4.5.1	Myokardiale mRNA Expressionsänderungen inflammatorischer Mediatoren	57
4.5.2	Inflammatorische Proteinlast im Myokard	58
4.5.3	Expressionsänderungen von Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren der inflammatorischen Reaktion	59
4.6	Kardiomyozytäre Inflamationsreaktion	60
4.6.1	kardiomyozytäre mRNA Expressionsänderungen von inflammatorischen Mediatoren nach <i>in vitro</i> Stimulation mit Zytokinmix	60
4.6.2	Kardiomyozytäre Freisetzung inflammatorischer Mediatoren nach Stimulation mit LPS und/oder HMGB-1	61
4.7	Modifikation der Kalziumhomöostase im Myokard nach Sepsis	63
4.7.1	Phospholamban Phosphorylierung nach polymikrobieller Sepsis	63
4.7.2	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und Matrix-Metalloproteinase 9	64
4.8	<i>In vitro</i> Untersuchung der Rezeptoren TLR2 und TLR4 im Rahmen der kardialen Dysfunktion	65
4.8.1	Auswertung der <i>in vitro</i> Plasmid-DNA/siRNA Transfektion	65
4.8.2	Inflamationsreaktion nach <i>in vitro</i> Transfektion	67

5	Diskussion	69
5.1	LED-TM wirkt protektiv in der Morbidität und Mortalität nach polymikrobieller Sepsis im Mausmodell	69
5.2	Fehlen der LED-TM führt zu einer stärker ausgeprägten kardialen Dysfunktion nach polymikrobieller Sepsis	71
5.3	Die LED-TM verringert die myokardiale Schädigung nach polymikrobieller Sepsis	72
5.4	Fehlen der LED-TM verstärkt die frühe systemische und myokardiale Inflamationsantwort	74
5.5	TM-LED moduliert die Verfügbarkeit von freiem HMGB1	76
5.6	Molekulare Merkmale der sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion	78
5.6.1	Modifikation der Kalziumhomöostase durch Phospholamban	78
5.6.2	Signaltransduktion durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	79
6	Schlussfolgerungen	83
	Literatur- und Quellenverzeichnis	85
	Anhang	- 96 -
	Abbildungsverzeichnis	- 96 -
	Tabellenverzeichnis	- 97 -
	Danksagung	- 98 -

Ehrenwörtliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Eigene Abkürzungen:

ALP	alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	aktiviertes Protein C
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCA	Bicinchoninsäure
BDM	Butanedione monoxime
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
(c) DNA	(<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CKMB	myokardiales Kreatin-Phosphokinase Isozym
CSS	<i>Clinical Severity Score</i>
C5a	<i>complement component 5a</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	verbreitete intravaskuläre Koagulation
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
Em.	Emissionswellenlänge
ESPVR	Endsystolische-Druck-Volumen-Beziehung
Ex.	Exzitationswellenlänge
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HMGB-1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HZV	Herzzeitvolumen
IL-1 β	<i>Interleukin 1β</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase

i.p.	intraperitoneal
KbE	Koloniebildende Einheit
KDM	kardiodepressive Mediatoren
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LED-TM	lektinartige Domäne des Thrombomodulin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODS	Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom
(m) RNA	(<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang [Anzahl/Gruppe]
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	<i>pathogen-associated microbial pattern</i>
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	<i>Phosphat buffered Saline</i>
pcDNA-hTM	vollständiges humanes Thrombomodulin kodierende Plasmid-DNA
pcDNA-hTM-ΔLLD	humanes Thrombomodulin ohne LED-TM kodierende Plasmid-DNA
PCI	(polymikrobielle) Peritoneale Kontamination und Infektion
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLN	Phospholamban
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	<i>Receptor for advanced glycolysation endproduct</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> (Standardfehler)
SERCA	sarko-endoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Host Response Syndrome</i>
TAFI(a)	Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor (aktiviert)
TdT	Terminale desoxynukleotidyl-Transferase
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
(r) TM	(rekombinantes) Thrombomodulin
TM ^{LeD/LeD}	lektinartige Domäne des Thrombomodulin <i>Knockout</i>
TNF-α	<i>Tumor-necrosis-factor α</i>

V _{ed}	enddiastolisches Volumen
WT	Wildtyp
ZM	Zytokinmix

SI-Einheiten:

Dezimale Teile und Vielfache von Einheiten:

f	Femto [1×10^{-12}]
p	Piko [1×10^{-12}]
n	Nano [1×10^{-9}]
μ	Mikro [1×10^{-6}]
m	Milli [1×10^{-3}]
d	Dezi [1×10^{-1}]
k	Kilo [1×10^3]

Einheiten:

L	Volumen [Liter]
g	Masse [Gramm]
mol	Stoffmenge [Mol]
M	Konzentration [mol/L]
°C	Temperatur [Grad Celsius]
%	Anteil [Prozent, 1/100]
s	Zeit [Sekunde]
min	Zeit [Minute]
h	Zeit [Stunde]
U	Enzymaktivität [Unit, μmol/min]
× g	Zentrifugalkraft [Vielfaches der Erdanziehung g] $= (1,119 \times 10^{-5}) \cdot \text{rpm}^2 \cdot r$ rpm = Umdrehungen pro Minute r = Rotorradius [cm]
A	Stromstärke [Ampere]
Hz	Frequenz [Hertz, 1/sec]

Zusammenfassung

Einleitung: Die akute septische Kardiomyopathie stellt eine häufige und dennoch unterschätzte Komplikation während des septischen Krankheitsgeschehens dar, die mit einer deutlich erhöhten Sterblichkeit ein entscheidender prognostischer Faktor für das Überleben des Patienten ist. Die zugrunde liegenden komplexen molekularen Mechanismen, die Rolle von kardiodepressiven Mediatoren und deren Signaltransduktion über *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) innerhalb dieses Krankheitsbildes sind noch immer unzureichend verstanden. Das Protein Thrombomodulin besitzt entscheidende anti-inflammatorische Eigenschaften, die u. a. durch eine Interaktion der lektinartigen Domäne des Thrombomodulin (LED-TM) mit dem endogenen Alarmin *High-Mobility-Group-Box 1* (HMGB1) vermittelt werden. Infolgedessen werden nachgeschaltete pro-inflammatorisch wirkende Signale von HMGB1 unterbunden. Die Rolle der LED-TM im Rahmen der septischen Kardiomyopathie ist allerdings noch nicht bekannt.

Ziele der Arbeit: In der vorliegenden Arbeit soll erstmalig der Einfluss der LED-TM in der Pathogenese der murinen polymikrobiellen septischen Kardiomyopathie und deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen charakterisiert werden. Dadurch soll ein besseres Verständnis der septischen Kardiomyopathie und damit einhergehend perspektivisch eine verbesserte Diagnose und kausale Therapie dieser schweren Komplikation im Rahmen einer septischen Erkrankung ermöglicht werden.

Material und Methoden: Als kliniknahes Modell der Wirtsreaktion auf eine systemische Infektion wurde in diesem Zusammenhang *in vivo* ein polymikrobielles Sepsismodell unter Verwendung von LED-TM *Knockout* Mäusen und Wildtyp-Tieren angewandt. Die Tiere wurden auf ihr Überleben, die Krankheitsschwere, die generelle und kardiale inflammatorische Stressantwort anhand von Zytokinexpressionen sowie auf pathologische Veränderungen am Myokard untersucht. Es wurden sowohl allgemeine als auch organspezifische Schädigungsparameter erhoben. Die kardiomyozytäre Schädigung bei der polymikrobiellen Sepsis wurde anhand des Markers Troponin I bestimmt. Zudem erfolgte die Bestimmung des frei verfügbaren HMGB1 nach Sepsis. Zur Evaluation der myokardialen Leistung wurden *in vivo* direkte intrakardiale Druck-Volumen-Messungen vorgenommen. Zusätzlich wurden primäre Kardiomyozyten aus Mäusen isoliert, um die kardiomyozytäre inflammatorische Stressantwort und die zugrunde lie-

genden molekularen Mechanismen in Abhängigkeit von der LED-TM nach Stimulation zu untersuchen.

Ergebnisse und Diskussion: Ein Fehlen der LED-TM war sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einer verstärkten Inflamationsreaktion verbunden sowie *in vivo* mit einer schlechteren Prognose. Die immunmodulatorischen Effekte in Form einer gesteigerten Zytokinproduktion traten innerhalb der ersten Stunden nach Sepsis auf und verstärkten so die myokardiale Schädigung und reduzierten die myokardiale Leistung. Eine Störung des β -adrenergen Signalweges und der Kalziumhomöostase im Myokard zeigte sich unabhängig von der LED-TM ebenfalls früh im Laufe der Sepsis. Es war grundsätzlich keine vermehrte Infiltration durch neutrophile Granulozyten oder erhöhtes Apoptosevorkommen im Myokard nachweisbar, auch nicht in Abwesenheit der LED-TM. Die Hyperinflammation wurde primär regional von den Kardiomyozyten selbst getrieben, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine gesteigerte Produktion von kardiodepressiven Mediatoren in Folge einer Inflammation bzw. Stimulation zeigten und so autokrine Wirkungen auf die kardiale Leistung produzierten. Weiterhin zeigte sich *in vivo* eine deutlich positive Korrelation zwischen erhöhten HMGB1-Spiegeln und Troponin I im Plasma nach experimenteller Sepsis. HMGB1 löste zudem in Kardiomyozyten *in vitro* vergleichbare Expressionsmuster in der inflammatorischen Stressantwort aus wie das Endotoxin Lipopolysaccharid, die in Abwesenheit der LED-TM konsistent verstärkt auftraten. Die kardiomyozytäre inflammatorische Signaltransduktion über die TLR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Schlussfolgerungen: In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die LED-TM die myokardiale Inflamationsreaktion und damit die kardiale Depression über Bindung von HMGB1 verringert. HMGB1 stellt sich insgesamt als ein potentieller Schädigungsmarker dar, der in Kombination mit kardialen Troponin von entscheidender Diagnoserelevanz für eine septische Kardiomyopathie in Betracht gezogen werden sollte. Zusammenfassend bieten die hier gewonnenen Erkenntnisse über die modulatorischen Effekte der LED-TM bei der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie der kardialen Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis.

1 Einleitung

Die akute septische Kardiomyopathie stellt eine häufige Organdysfunktion während des septischen Krankheitsgeschehens dar und ist mit einer deutlich erhöhten Sterblichkeit ein entscheidender prognostischer Faktor für das Überleben des Patienten. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieses Krankheitsbildes sind noch immer unzureichend verstanden, wobei deren Aufklärung einen entscheidenden Ansatz für eine therapeutische Intervention bei septischen Patienten leisten könnte. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der lektinartigen Domäne des Thrombomodulin (LED-TM) in der murinen polymikrobiellen septischen Kardiomyopathie betrachtet werden.

1.1 Sepsis

Die Sepsis ist ein lang bekanntes Syndrom in der Medizin, welches lange Zeit vereinfacht als eine primär unkontrollierte Entzündungsreaktion im Wirt auf ein Pathogen betrachtet wurde (Thomas 1972, Cerra 1985). Die Definition von Sepsis beruht heute noch auf den aufgestellten Kriterien einer Konsensus-Konferenz im Jahre 1992 (Bone et al. 1992) und wird als eine komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion verstanden, deren Diagnose von mehreren Parametern abhängt (Tabelle 1). Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock definieren ein Krankheitskontinuum, das über eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen definiert wird, bei gleichzeitiger Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien (Tabelle 1, Reinhart und Brunkhorst 2010). Die Entwicklung eines progressiv fortschreitenden Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms (MODS) im Verlauf des Krankheitskontinuums Sepsis ist charakterisiert durch eine potentiell reversible physiologische Dysfunktion in zwei oder mehr Organen oder Organsystemen (Deitch 1992). Es ist bekannt, dass die Pathogenese septischer Krankheitsbilder sehr komplex ist und durch eine Vielzahl miteinander agierender Faktoren beeinflusst wird (Angus und van der Poll 2013), wobei deren Interaktionen nach wie vor unzureichend verstanden sind. Unabhängig vom auslösenden Insult zeigt das MODS eine teilweise vorhersehbare Reihenfolge der betroffenen Organe. Beginnend mit einem generalisierten Endothelschaden (Wang und Ma 2008) zeigt sich dann meist zuerst die Lunge, gefolgt vom Gerinnungssystem, der Leber, dem Darmtrakt und der Nieren als betroffen (Deitch 1992).

Tabelle 1: Definition von *Systemic Inflammatory Host Response Syndrome* (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischen Schock

Syndrom	Kriterien
SIRS	≥ 2 Kriterien: ❖ Fieber ($\geq 38\text{ °C}$) oder Hypothermie ($\leq 36\text{ °C}$) ❖ Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ ❖ Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) ohne Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa}/\leq 33\text{ mmHg}$) ❖ Leukozytose ($\geq 12\ 000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($4\ 000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblut
Sepsis	Nachweis der Infektion und SIRS
schwere Sepsis	Sepsis + akute Organdysfunktion (≥ 1 Kriterium): ❖ Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium ❖ Thrombozytopenie: $\leq 100\ 000/\text{mm}^3$ bzw. $> 30\%$ Abfall der Thrombozytenzahl in 24 h ❖ Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10\text{ kPa}/\leq 75\text{ mmHg}$ bei Raumluft oder $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 33\text{ kPa}/\leq 250\text{ mmHg}$ unter Sauerstoffapplikation ❖ Renale Dysfunktion: Diurese von $\leq 0,5\text{ mL/kg/h}$ für mind. 2 h trotz adäquater Volumengabe u./o. Serumkreatinin ≥ 2 -fach erhöht gegenüber Referenzbereich ❖ Metabolische Azidose: Laktat $\geq 1,5$ -fach erhöht gegenüber Referenzbereich
septischer Schock	Sepsis + Hypotonie (systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90\text{ mmHg}$ bzw. mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65\text{ mmHg}$) für wenigstens 1 Stunde trotz adäquater Volumengabe bzw. notwendiger Vasopressoreinsatz um den Blutdruck oberhalb dieser Referenzwerte zu halten

(nach Reinhart und Brunkhorst 2010)

Obwohl aktuelle Erkenntnisse in der Sepsisforschung aus Bereichen der klinischen Studien und molekularbiologischen Forschung kontinuierlich Berücksichtigung in den Empfehlungen zur Diagnose und Therapie für Notfallmediziner finden (Jones und Puskarich 2014), bleibt die Sepsis mit der komplexen Pathogenese und den immer noch unzureichenden diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten mit einer Mortalitätsrate von 40 bis 60% trotz intensiver Forschungsbemühungen auch heute noch eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (Angus und Wax 2001, Engel et al. 2007, Fernandes und de Assuncao 2012). Etwa 60.000 Menschen versterben pro Jahr allein in Deutschland an den Folgen septischer Erkrankungen und stellen damit nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache dar (Brunkhorst 2006, Moerer und Quintel 2009). Eine sepsis-induzierte kardiale Dysfunktion ist eine häufige Komplikation während des septischen Krankheitsgeschehens (Rudiger und Singer 2013), wobei das Vorliegen einer Kardiomyopathie während einer Sepsis mit einer deutlich erhöhten Sterblichkeit von 70 bis 90% einhergeht

und damit einen wichtigen Prognose bestimmenden Faktor repräsentiert (Parker et al. 1987, Merx und Weber 2007).

1.2 Sepsis-induzierte Kardiomyopathie

Das Auftreten einer kardiovaskulären Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis wurde erstmals 1951 beschrieben (Waisbren 1951, Merx und Weber 2007). Bereits 1981 konnten Calvin und Kollegen eine verringerte Ejektionsfraktion (EF) und gesteigertes Enddiastolisches Volumen (V_{ed}) in septischen Patienten nachweisen (Calvin et al. 1981, Merx und Weber 2007). Parker et al. ergänzte 1984 diese initialen Charakteristika durch die entscheidende Beobachtung, dass sich bei Überleben der septischen Erkrankung die akute Reduktion der Herzfunktion nach etwa 7 bis 10 Tagen nach Auftreten des septischen Schocks vollständig zurückbildeten. Die „akute septische Kardiomyopathie“ unterscheidet sich in der Reversibilität von allen anderen Formen der Kardiomyopathie, wobei dieses Krankheitsbild seit 1989 unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Charakteristika so bezeichnet wird (Schuster 1989, Parillo 1989, Müller-Werdan 1998). Dabei handelt es sich um eine sekundäre Kardiomyopathie, die im Rahmen einer systemischen Erkrankung auftritt (Müller-Werdan et al. 2006, Werdan et al. 2009, Phillips und Kaynar 2012). Eine kardiovaskuläre Dysfunktion ist als eine frühe Erscheinung während des septischen Krankheitsgeschehens bekannt (Rudiger und Singer 2007), wobei sich deren Ausprägung entsprechend des zeitlichen Verlaufs und der Krankheitschwere des Syndroms Sepsis im Wesentlichen in zwei Teile gliedern lässt. Die frühe Phase ist gekennzeichnet durch einen hypermetabolischen und hyperdynamen Zustand, der durch eine erhöhte linksventrikuläre EF ($> 55\%$) und gesteigertes Herzzeitvolumen (HZV) gekennzeichnet ist bei gleichzeitig vermindertem systemischen Gefäßwiderstand (Deitch 1992, Jones et al. 2005). Laut Schätzungen, beruhend auf echokardiografischen Untersuchungen, entwickeln etwa 40 bis 60% der Patienten im septischen Schock eine myokardiale Depression in Form eines hypodynamischen Zustands innerhalb der ersten drei Tage, welcher durch eine reduzierte EF ($< 45\%$) und normales bis erhöhtes HZV gekennzeichnet ist (Müller-Werdan 1998, Rudiger und Singer 2007, Vieillard-Baron et al. 2008).

Ferner entwickeln mehr als 90% der Patienten im septischen Schock einen reduzierten systemischen Gefäßwiderstand durch Vasodilation (Parker et al. 1987, Parillo 1989, Bone 1991). Das Phänomen der sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion wurde im klinischen Alltag jedoch lange Zeit unterschätzt (Parillo 1989). Etwa 10% aller Todes-

fälle während des septischen Krankheitsbildes werden durch die Störung der Herzfunktion hervorgerufen (Parillo 1989). Für eine ausreichende Perfusion der Gewebe ist ein ausreichender Blutdruck erforderlich, was aufgrund der gestörten Gefäßregulation und dem einhergehenden verringerten systemischen Gefäßwiderstandes auf bis zu 30% der Norm, durch einen Anstieg des HZV um das 3- bis 4-fache bewerkstelligt werden müsste (Müller-Werdan 1998). Bei septischen Patienten wird eine derart starke Kompensation in den meisten Fällen nicht erreicht, es liegt trotz scheinbar normaler bis gesteigerter Leistungsparameter eine Pumpfunktionsstörung aufgrund der Sepsis vor. Die verminderte Herzfrequenzvariabilität wird als Zeichen einer autonomen Dysfunktion angesehen (Müller-Werdan 1998). Das Herz kann simultane und sich ähnelnde Muster der Dysfunktion in beiden Ventrikeln entwickeln, sowohl die systolische als auch die diastolische Herzfunktion betreffend (Parker et al. 1990), wobei diese Störungen oftmals den linken Ventrikel betreffen und er erheblich dilatiert ist (Merx und Weber 2007). Die Behandlung einer akuten septischen Kardiomyopathie entspricht im Wesentlichen der generell bei Sepsis angewandten Therapie und wird daher bisher durch die Applikation vasopressorischer und positiv inotroper Medikamente zur Stabilisierung des Blutdrucks und Erhöhung des HZV bei gleichzeitiger adäquater Flüssigkeitssubstitution angestrebt (Brunkhorst et al. 2007, Fernandes und de Assuncao 2012).

1.2.1 Mechanismen der septischen Kardiomyopathie

Die septische Kardiomyopathie scheint, unabhängig vom auslösenden Pathogen, durch ähnliche molekulare Reaktionsmechanismen vermittelt zu werden (Müller-Werdan 1998, Werdan et al. 2009). Dafür spricht auch die Existenz der sogenannten SIRS-Kardiomyopathie, welche bei einer systemischen inflammatorischen Reaktion ohne Nachweis einer Infektion, wie beispielsweise nach einem schweren Trauma, in vergleichbarer Ausprägung zu einer septischen Kardiomyopathie auftreten kann (Müller-Werdan et al. 2006). Außerdem scheinen insgesamt eher funktionelle als strukturelle Veränderungen maßgeblich zu sein (Rudiger und Singer 2007). Jedoch konnte die Kardiodepression bisher weder auf eine Koronarinsuffizienz trotz Vasodilatation und erhöhtem systemischen Gefäßwiderstand (Cunnion et al. 1986, Hotchkiss et al. 1991) noch auf eine erhöhte Inzidenz von Rhythmusstörungen (Müller-Werdan et al. 1997) zurückgeführt werden. Tachykardie tritt häufig im Rahmen einer septischen Erkrankung auf, wobei sich während einer Sepsis typischerweise hohe Katecholaminspiegel im Kreislauf der Patienten finden lassen (Bocking et al. 1979, Bernardin et al. 1998, Anna-

ne et al. 1999), die durch eine autonome Dysregulation und aktivierte Immunzellen verursacht sind (Bergquist et al. 1994, Flierl et al. 2007). Daher wird die Herzrate auch als prognostischer Parameter für das Überleben der Patienten mit septischem Schock beschrieben (Azimi und Vincent 1986). Eine Vielzahl an pathophysiologischen Mechanismen wird für die Ausprägung einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion beschrieben, die hauptsächlich durch Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO) reguliert werden (Chung et al. 1990, Barth et al. 2006, Rudiger und Singer 2007, Fernandes et al. 2008a). Aufgrund der komplexen Pathogenese der septischen Kardiomyopathie sollen im Folgenden einige pathophysiologischen Mechanismen und deren Interaktionen miteinander genauer beleuchtet werden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.2.1.1 Störung der β -adrenergen Signaltransduktion

Unter physiologischen Bedingungen verursacht der β -adrenerge Signalweg durch Agonistenbindungen (G-Proteine) an dem β -adrenergen Rezeptor die Aktivierung von Adenylatzyklen und darüber die Bildung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) als *second messenger*. Während einer Sepsis kommt es zu einer Störung der β -adrenergen Signaltransduktion an der Zellmembran der Kardiomyozyten (Chung et al. 1990). Zum einen liegt der β -adrenerge Rezeptor selbst während der Sepsis in einer geringeren Dichte in der Membran der Kardiomyozyten vor (Tang und Liu 1996) und zum anderen wird zusätzlich die Signaltransduktion durch Agonisten verändert (Rudiger und Singer 2007). Während stimulierende G-Proteine des β -adrenergen Rezeptors weniger exprimiert werden (Matsuda et al. 2000), kommt es zu einer vermehrten Expression von inhibierenden G-Proteinen (Böhm et al. 1995, Wu et al. 2003). Der unter physiologischen Bedingungen positiv inotrope Effekt der β -adrenergen Signaltransduktion zeigt sich unter pathophysiologischen Bedingungen durch eine geringere cAMP Konzentration und damit Proteinkinase A (PKA)-Aktivität im Myoplasma verringert. PKA ist entscheidend an der Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) beteiligt und beeinflusst darüber das intrazelluläre Kalziumsignal und die Kontraktion der Kardiomyozyten (MacLennan und Kranias 2003). Eine kurzfristige β -adrenerge Stimulation mit Katecholaminen ist mit positiven Effekten auf die Inotropie (Kontraktion), Lusitropie (Relaxation) und Chronotropie (Herzrate) verbunden, wohingegen eine verlängerte und supraphysiologische Stimulation mit Katecholaminen den intrazellulären Kalziumflux inhibiert (Bers 2002) und darüber zu myokardialer Schädigung mit Nekrose führt

(Opie 2004, Rudiger und Singer 2007). Verschiedene Studien haben zeigen können, dass erhöhte Katecholaminspiegel in der Sepsis auftreten (Phillips und Kaynar 2012), sowohl im Patienten (Bocking et al. 1979, Bernardin et al. 1998, Annane et al. 1999) als auch im Tiermodell (Hahn et al. 1995, Iwase et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine verringerte β -adrenerge Signaltransduktion mit erhöhten NO-Konzentrationen assoziiert ist (Hare et al. 1995, Barth et al. 2006). Darüber hinaus können zirkulierende Katecholamine durch Superoxide inaktiviert werden (Macarthur et al. 2000). Es ist bekannt, dass NO über zwei wesentliche Signalwege die β -adrenerge Signaltransduktion stört: Der zyklische Guanosin-Monophosphat (cGMP)-unabhängige Signalweg kommt durch eine hauptsächliche Störung der Adenylatzyklasen und dadurch verminderte cAMP-katalysierte PKA Aktivität zustande. Darüber hinaus sind cGMP-abhängige Signalwege bekannt, die über eine Aktivierung von Guanylatzyklase und Protein Kinase G (PKG) zum einen zu einer TroponinI-Phosphorylierung durch PKG führen (Layland et al. 2002) und dadurch eine Reduktion der Kalziumsensitivität der Myofilamente verursachen (Yasuda und Lew 1997). Weiterhin verursacht PKG eine Inhibition des L-Typ-Kalziumkanals (Ziolo et al. 2001a).

1.2.1.2 Störung von Kalziumflux und –homöostase

Phospholamban (PLN) ist ein Transmembranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums im Myokard, welches abhängig vom Phosphorylierungszustand die Aktivität der sarko-endoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA) reguliert (MacLennan und Kranias 2003). Die SERCA-Aktivität ist maßgeblich am Rücktransport von zyttoplasmatischen/myoplasmatischem Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum verantwortlich und bestimmt dadurch zum einen die Herzmuskelrelaxation während der Diastole und folglich weiterhin den sarkoplasmatischen Kalziumspeicher, welcher wiederum die Kontraktionskraft des nächsten Schlages durch die Kalziumverfügbarkeit beeinflusst (MacLennan und Kranias 2003). Liegt PLN hypophosphoryliert vor, bindet es an SERCA und senkt dadurch die Kalziumaffinität des intrazellulären Kalziumtransporters. Der gesenkte Kalziumflux resultiert in einer verlängerten Relaxationszeit, einer gesenkten Kontraktilität und einer kardialen Dysfunktion.

1.2.1.3 Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Endopeptidasen, die sowohl den kontraktilen Apparat (also kardiales Troponin I) als auch das Zytoskelett (hauptsächlich α -Actinin betreffend) abbauen (Wang et al. 2002a, Gao et al. 2003, Rork et al. 2006, Sung et al.

2007). Die Aktivität von MMPs wird in der Sepsis sowohl durch inflammatorische Zytokine wie *Interleukin 1 β* (IL-1 β) und *Tumor-necrosis-factor α* (TNF- α) als auch durch Peroxynitrit induziert (Ferdinandy et al. 2000, Wang et al. 2002b, Kohr et al. 2012).

1.2.1.4 Monozyten-Aktivierung, Adhäsion und Infiltration

Die Aktivierung von zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten als Teil der angeborenen unspezifischen Immunantwort des Wirts in Folge der Sepsis, führt zu einer Einwanderung dieser Immunzellen in die betroffenen Gewebe und einer vermehrten Freisetzung von pro-inflammatorisch wirkenden Mediatoren in den Kreislauf (Arras et al. 1996, Faix 2013). Daher werden unter anderem Monozyten, sowie die von diesen freigesetzten Zytokine und Chemokine, als zentrale Elemente in der früh auftretenden hyperinflammatorischen Entgleisung und Paralyse des Immunsystems während des septischen Krankheitsgeschehens angesehen (Cavaillon et al. 2003, Faix 2013). Entscheidende pro-inflammatorisch wirkende Mediatoren, die ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion des Herzens führen, sind TNF- α , IL-1 β , *Interleukin 6* (IL-6) und *complement component 5a* (C5a) (Liu und Schreuer 1995, Kumar et al. 1996, Meldrum 1998, Niederbichler et al. 2006). Unter pathophysiologischen Bedingungen bilden Kardiomyozyten, unabhängig von den Zellen des Immunsystems, selbst diese pro-inflammatorischen Mediatoren und fungieren dadurch als immunaktive Zellen (Kapadia et al. 1995, Meldrum 1998, Müller-Werdan und Werdan 2001, Flierl et al. 2008). Neben den systemisch gebildeten pro-inflammatorischen Botenstoffen stellt die lokale myokardiale Produktion dieser, ebenfalls eine autokrine Quelle kardiodepressiv wirkender Mediatoren dar.

1.2.1.5 Kardiodepressive Mediatoren

Als wesentliche und gut belegte Ursache für die Ausprägung einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion wird eine Kardiodepression beschrieben, die hauptsächlich auf Zytokine und NO zurückgeführt wird (Kumar et al. 1996, Kojda und Kottenberg 1999, Rudiger und Singer 2007, Fernandes et al. 2008a). Die initial systemisch von Monozyten und neutrophilen Granulozyten oder regional von Kardiomyozyten gebildeten kardiodepressiven Mediatoren (KDM) lassen sich wiederum in primäre und sekundäre KDM gliedern. Primäre KDM sind Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6, die zu einer Veränderung des Kalziumflux und –homöostase durch Minderung des Kalziumstroms über funktionelle L-Typ-Kalziumkanäle und Blockade des sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptors im Myokard führen (Liu und Schreuer 1995, Krown et al. 1995, Lew et

al. 1996, Oral et al. 1997, Ziolo et al. 2001a). Während der initialen hyperinflammatorischen Phase der Sepsis gehören diese Interleukine zu den prominentesten Zytokinen, die ursächlich für die Sepsis-assoziierten systemischen Reaktionen und den septischen Schock identifiziert wurden, wobei der kardiovaskuläre Kollaps eine terminale Komplikation der schweren Sepsis für den Patienten darstellt (Faix 2013). Sind diese Zytokine einmal exprimiert, können diese KDM also direkte Effekte auf die Zellen ausüben und weiterhin an ihre Rezeptoren binden, oder indirekte Effekte indem sie Komponenten des adaptiven Immunsystems durch vermehrte Regulation von *cell adhesion molecules* (CAM) initiieren und damit Neutrophile und Monozyten anziehen (Knuefermann et al. 2004b). Diese Zytokine induzieren weiterhin die Bildung von sekundären KDM über die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), die zu einer vermehrten Freisetzung von NO führt (Rozanski et al. 1994, Kodja und Kottenberg 1999) und weiterhin die Bildung von Superoxidradikalen wie Peroxynitrit unterstützt (Kohr et al. 2012). Außerdem wird durch Aktivierung des Spingomyelinasesignalwegs eine erhöhte Ceramid- und Spingosinsynthese eingeleitet, welche wiederum durch Eingriffe in zelluläre Prozesse wie Kalziumhomöostase und mitochondriale Dysfunktion eine Kardiodepression auslöst (Oral et al. 1997, Meldrum et al. 1998, Wu et al. 2002, Kohr et al. 2012). Peroxynitrit ist dabei ein zentrales Signalmolekül, da es in hohen Konzentration sowohl die SERCA- als auch Ryanodinrezeptor-Aktivität direkt stört (Ziolo et al. 2001b, Terentyev et al. 2003, Kohr et al. 2009), weiterhin die mitochondriale Atmungskette inhibiert (Brookes 2004) und MMP aktiviert, die Troponin I und α -Actinin abbauen (Kohr et al. 2012). Ein weiteres pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin ist das Chemokin *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), welches sowohl Monozyten zur Migration in die betroffenen Areale anregt, als auch die Synthese von dem anti-inflammatorisch wirkenden Zytokin *Interleukin 10* (IL-10) steuert. IL-10 hemmt wiederum die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wobei eine Überexpression von IL-10 in der kompensatorischen anti-inflammatorischen Phase zu einer Immunsuppression und Paralyse des Immunsystems führt (Moore et al. 2001, An et al. 2012). Des Weiteren kann sich die Inflammation in den Geweben und folglich die Kardiodepression selbst erhalten, in dem bereits geschädigte Zellen *damage-associated molecular patterns* (DAMP) freisetzen, die ähnliche Reaktionen wie *pathogen-associated microbial pattern* (PAMP) hervorrufen. Ein klassisches DAMP ist beispielsweise das DNA-bindende Protein *High-Mobility Group Box1* (HMGB1), welches hauptsächlich von nekrotischen Zellen oder auch akti-

vierten Immunzellen freigegeben wird und als endogenes Alarmin wie Zytokine wirkt (Bianchi 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch von vitalen Kardiomyozyten in Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), HMGB1 aktiv produziert und sezerniert wird und zu einer Kardiodepression führt (Xu et al. 2010).

Alle genannten pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine tragen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Sepsis und besitzen zudem kardiodepressive Eigenschaften. Neben der Rolle als Mediatoren und ihrer Beteiligung in komplexen Signalkaskaden innerhalb des Krankheitskontinuums Sepsis werden sie auch als mögliche Biomarker für die Diagnose bzw. Prognose einer Sepsis diskutiert (Faix 2013).

1.2.2 Forschungsansätze

In der Diskussion über die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine haben wegweisende Forschungsergebnisse über *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-abhängige Mechanismen ebenfalls neue Horizonte im pathophysiologischen Verständnis der entgleisenden Immunreaktion nach Sepsis sowie den möglichen Therapieoptionen einer kardialen Dysfunktion ermöglicht. Jeder Erreger besitzt phylogenetisch hoch konservierte Strukturen, sogenannte PAMP, die es dem Immunsystem des Wirts mit Hilfe der *pattern recognition receptors* (PRR), zu denen neben den C-typ-Lektin-Rezeptoren auch die TLR zählen, erlaubt zwischen körpereigenen und körperfremden Mustern zu unterscheiden (Geijtenbeek und Gringhuis 2009, Akira 2009). Zu diesen PAMP zählen beispielsweise Komponenten der Zellmembran/-wand wie LPS von gramnegativen Bakterien und Lipoteichonsäuren von grampositiven Bakterien oder auch bakterielle DNA. TLR sind nicht nur in Immunzellen präsent, sondern auch in den meisten anderen Geweben nachweisbar, unter anderem im Herzen, und nehmen dort eine zentrale Rolle bei jeglicher Reaktion auf zellulären Stress ein (Knuefermann et al. 2004b). TLR4 ist ein membranständiger Rezeptor für Zellwandbestandteile von gramnegativen Organismen (LPS/Lipopolysaccharid-bindendes Protein Komplex) und TLR2 für Zellwandbestandteile von grampositiven Organismen (Knuefermann et al. 2002, Knuefermann et al. 2004a). HMGB1 bindet als endogener Ligand an TLR2 und TLR4 und initiiert so die inflammatorische Signalkaskade (Akira 2009). In der Identifizierung weiterer Liganden dieser Rezeptoren und der Aufklärung der Signalkaskade im Rahmen der Ausprägung einer septischen Kardiomyopathie besteht jedoch weiterhin Forschungsbedarf.

1.3 Thrombomodulin und Sepsis

Thrombomodulin (TM) ist ein Typ-I-Transmembranglykoprotein welches eine wichtige Funktion als Thrombin-Rezeptor hat. Die Bildung des Thrombin-TM Komplexes vervielfacht die Rate der Protein C Aktivierung um mehr als ein 1000-faches. TM wird vorwiegend von vaskulären Endothelzellen exprimiert und reguliert dort maßgeblich die intravaskuläre Koagulation (Van de Wouwer et al. 2004). TM wird weiterhin auch von Kardiomyozyten exprimiert (Li et al. 2010). Die Expression von Thrombomodulin ist während verschiedener inflammatorischer Erkrankungen gestört (Conway und Rosenberg 1988, Moore et al. 1989, Gando et al. 1995, Boehme et al. 1996, Conway 2012), was zu einer Hyperkoagulopathie, wie beispielsweise der sepsis-assoziierten Koagulopathie und verbreiteten intravaskulären Koagulation (DIC), führen kann. Erhöhte Spiegel von löslichem TM-Fragmenten korrelieren mit einer erhöhten Organschädigung und Sterblichkeit im Patienten (Orwoll et al. 2015). Rekombinantes TM (rTM) besitzt dieselbe Aktivität wie membrangebundenes TM. rTM wird, nach einem erfolgreichen Abschluss einer Phase III klinischen Studie in Japan, in der die verbesserte Sicherheit gegenüber Heparin hinsichtlich des Blutungsrisikos und erfolgreiche Therapie von einer DIC mit rTM bestätigt werden konnte (Saito et al. 2007), in Japan schon seit 2008 zur Therapie der DIC verwendet. Dort ist es kommerziell unter dem Namen RecomodulinTM (ART-123) (Asahi Kasei Pharma Corporation, Tokyo, Japan) verfügbar. Die Rechte an dem Medikament für den Markt außerhalb von Japan, China, Taiwan und Korea besitzt Artisan Pharma (Waltham, USA). Nach dem erfolgreichem Abschluss der internationalen klinischen Studie Phase IIb (Vincent et al. 2013), kann mit der Marktzulassung für diese Indikation nach der Phase III gerechnet werden.

Retrospektive Beobachtungsstudien aus Japan bestätigen verbesserte Überlebenschancen der Patienten mit Sepsis, die mit rTM behandelt wurden (Yamakawa et al. 2013, Yamakawa et al. 2015), wobei eine kürzlich veröffentlichte ergänzende Post-hoc Analyse diese positiven Effekte auf eine Subpopulation von Hochrisiko-Patienten mit vorwiegend respiratorischer oder kardialer Dysfunktion und Koagulopathie eingrenzte (Yoshimura et al. 2015).

Obwohl TM als ein viel versprechender Kandidat vornehmlich für die antikoagulatorische Therapie von sepsis-assoziiierter DIC diskutiert wird (Ito et al. 2015), blieben die möglichen vorteilhaften Effekte von TM während einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion, vermittelt durch die anti-inflammatorisch wirkende lektinartige Domäne des Proteins (LED-TM), bisher unbeachtet.

1.3.1 Struktur und Funktion von Thrombomodulin

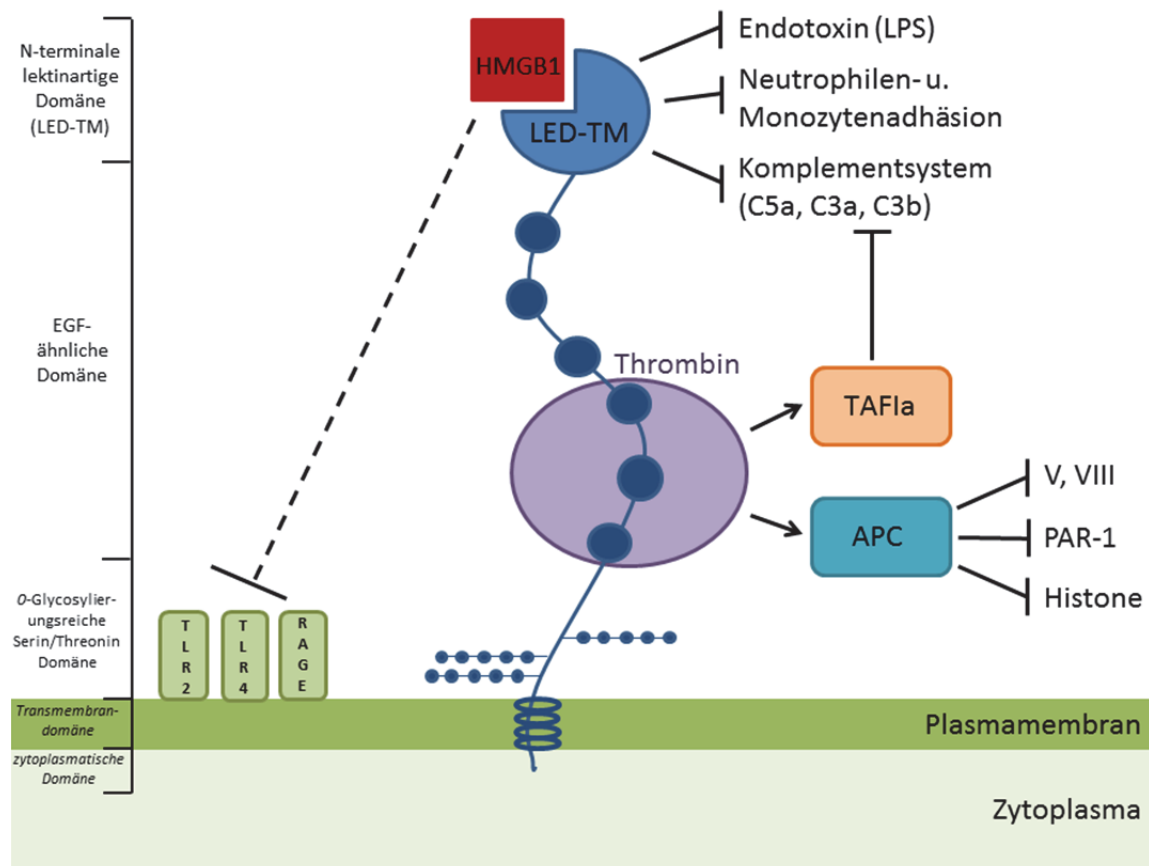


Abbildung 1: Struktur und Funktion von Thrombomodulin

Thrombomodulin (TM) besteht aus 5 verschiedenen Domänen entsprechend der Einteilung im linken Abschnitt der Abbildung. Die anti-koagulatorische Funktion des Proteins wird hauptsächlich durch die *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche Domäne vermittelt, die mit hoher Affinität an Thrombin bindet und dadurch zum einen die weitere Synthese von Thrombin über die Koagulationsfaktoren V und VIII unterbindet und weiterhin Protein C aktiviert (APC). Alternativ kann die Bindung von Thrombin auch an die Serin/Threoninreiche Domäne von TM erfolgen, allerdings mit einer geringeren Affinität zu Thrombin. APC aktiviert den Protease-aktivierten Rezeptor PAR1, was wiederum zellprotektive Signalkaskaden initiiert und zu einer Stabilisierung der zellulären Integrität führt. Weiterhin baut APC extrazelluläre Histone in nicht-zytotoxische Spaltprodukte ab und mindert dadurch die pathologischen Effekte von Histonen während einer Sepsis. Über Aktivierung des Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse-Inhibitors (TAFIa) kommt es zu einer Inhibition des Komplementsystems anhand der Inaktivierung der Komplementfaktoren C3b, C3a und C5a. Die lektinartige Domäne des Thrombomodulin (LED-TM) vermittelt darüber hinaus direkte anti-inflammatorische Effekte, in dem sie den Komplementfaktor C3 inhibiert und darüber hinaus die Infiltration von Immunzellen moduliert. Weiterhin wird sowohl das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) durch die LED-TM gebunden als auch das endogene Alarmin *High-Mobility Group Box-1* (HMGB1), so dass dessen Interaktion mit den *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) 2 und 4 sowie dem *Receptor for advanced glycosylation endproduct* (RAGE) unterbunden wird. (Abbildung modifiziert nach Ito et al. 2015)

Eine zusammenfassende schematische Darstellung über die Struktur und bekannten Funktionen von TM ist in Abbildung 1 dargestellt. TM besteht aus 5 verschiedenen Domänen: einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz, einer Transmembrandomäne, einer Serin/Threoninreichen Domäne, sechs zusammenhängenden *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche Domänen und der N-terminalen LED-TM im extrazellulären Raum (Suzuki et al. 1987). Die antikoagulatorische Funktion des Proteins wird hauptsächlich durch die EGF-ähnlichen Domänen vermittelt, die mit hoher Affinität Thrombin binden und dadurch zum einen die weitere Synthese von Thrombin über die Koagulationsfaktoren V und VIII unterbinden und weiterhin die prokoagulatorische Substratspezifität von Thrombin zu Fibrinogen in eine antikoagulatorische Substratspezifität für Protein C verändert (Esmon 1987, Fuentes-Prior et al. 2000, Conway 2012). Alternativ kann die Bindung von Thrombin auch an die Serin/Threoninreiche Domäne von TM erfolgen, allerdings mit einer geringeren Affinität zu Thrombin (Conway 2012). Neben dieser prominenten antikoagulatorischen Funktion besitzt TM aber auch direkte und indirekte anti-inflammatorische Eigenschaften.

1.3.1.1 Indirekte anti-inflammatorische Wirkung von Thrombomodulin

Indirekte anti-inflammatorische Aktivität wird zum einen über die Aktivierung von Protein C (APC) und zum anderen über Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) vermittelt. APC aktiviert den Protease-aktivierten Rezeptor PAR1, was wiederum zu einer Herabregulation von proapoptotischen und pro-inflammatorischen Signalkaskaden bei vermehrter Regulation anti-inflammatorischer und antiapoptotischer Signalwege zu einer Stabilisierung der zellulären Integrität führt (Bernard et al. 2001, Griffin et al. 2012, Griffin et al. 2015). Weiterhin baut APC extrazelluläre Histone in nicht-zytotoxische Spaltprodukte ab und mindert dadurch die pathologischen Effekte von Histonen während einer Sepsis (Xu et al. 2009, Nakahara et al. 2013). Über TAFI-Aktivierung (TAFIa) kommt es zu einer Inhibierung des Komplementsystems anhand der Inaktiverung der Komplementfaktoren C3b (Delvaeye et al. 2009), C3a und C5a (Nishimura et al. 2007).

1.3.1.2 Direkte anti-inflammatorische Wirkung von Thrombomodulin

Die LED-TM ähnelt den C-typ-Lektinrezeptoren, ihr fehlt allerdings die charakteristische Kalziumbindungsstelle (Conway 2012). Diese extrazelluläre Domäne des Proteins nimmt etwa 40% der Molekülmasse des Proteins ein und besitzt entscheidende direkte

anti-inflammatorische Eigenschaften unabhängig von der Bildung des Thrombin-TM-Komplexes und der Bildung von APC und TAFIa. Wichtig zu wissen ist, dass eine Deletion der LED-TM in Mäusen *in vivo* keinen Einfluss auf die Aktivierung von Protein C und die dadurch vermittelten Effekte hat (Conway et al. 2002, Van de Wouwer und Conway 2004, Conway 2012).

Über die LED-TM erfolgt ebenfalls *in vitro* eine Inaktivierung des Komplementfaktor C3 (Van de Wouwer et al. 2006, Conway 2012). Zudem zeigen die Mäuse, denen durch eine Mutation die LED-TM fehlt, sowohl in einem Arthritismodell in den Gelenken (Van de Wouwer et al. 2006) als auch im hämolytisch-uremischen Syndrom in den Nierenglomeruli (Zoja et al. 2012) erhöhte C3 Ablagerungen bereits unter basalen Bedingungen, welches die regulatorische Funktion der LED-TM für das Komplementsystem widerspiegelt. Neben dieser regulatorischen Funktion auf das Komplementsystem besitzt die LED-TM noch weitere entscheidende anti-inflammatorische Eigenschaften, indem es sowohl LPS (Ma et al. 2015), als klassisches PAMP, als auch HMGB1, als prototypischen DAMP und endogenes Alarmin, bindet. Mäuse, denen die LED-TM fehlt, zeigen ein geringeres Überleben nach LPS-induzierter systemischer Inflamationsreaktion (Conway 2002). Eine Administration von LED-TM nach LPS-Induktion verbesserte das Überleben und das Ausmaß der Organschädigung und Neutrophileninfiltration in Lunge und Niere der Mäuse, und verringerte weiterhin die Expression von TNF- α , NO und iNOS in murinen Makrophagen *in vitro* (Shi et al. 2008) und *in vivo* im Ischämie-Reperusionsmodell der murinen Lunge (Geudens et al. 2008). Weiterhin entwickeln die LED-TM defizienten Mäuse eine ausgeprägteres Hämolytisch-uremisches Syndrom nach Administration von Shigatoxin und LPS (Zoja et al. 2012). Abeyama und Kollegen berichteten ebenfalls, dass die LED-TM HMGB1 bindet (Abeyama et al. 2005), ein endogenes Alarmin mit zytokinähnlicher Aktivität (Yang et al. 2005). Park et al. berichteten 2004, dass HMGB1 sein pro-inflammatorisches zelluläres Signal durch die Interaktion mit den Rezeptoren TLR2 und TLR4 neben derer mit RAGE vermittelt, womit diese Studie die erste war, die eine maßgebliche Beteiligung dieser TLR in der inflammatorischen Signaltransduktion nachwies. Der gemeinsame Signalweg für diese Rezeptoren involviert eine MyD88-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (Lotze und Tracey 2005; Yang et al. 2005). Zu erwähnen ist auch, dass HMGB1 als ein verhältnismäßig später Mediator der Inflammation angesehen wird, da signifikante Plasmaspiegel erst einige Stunden nach anderen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β detektiert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass

in Folge dieser anderen Zytokine, HMGB1 als endogenes Alarmin aus aktivierten Immunzellen sezerniert wird (Yang et al. 2005).

1.3.2 Thrombomodulin und Herz

Wie bereits erläutert besitzt TM durch die LED-TM entscheidende anti-inflammatorische Eigenschaften und wird auch von Kardiomyozyten exprimiert. Die vorteilhaften Effekte der LED-TM ließen sich auch im Rahmen von myokardialer Ischämie und Reperfusion nachweisen. Schon im Jahr 2002 zeigten Conway und Kollegen, dass die Infarktgröße und die Neutrophileninfiltration in den Tieren denen die LED-TM fehlt nach myokardialer Ischämie und Reperfusion deutlich erhöht ist. Eine fortführende Studie von Herzog et al. 2014 konnte diese Beobachtungen bestätigen und durch die Beobachtung von erhöhten Level für Zytokine wie IL-1 β und TNF- α ergänzen. Weiterhin zeigte sich in dieser Studie ein erhöhtes Apoptosevorkommen, sowie erhöhte Level für HMGB1 *in vivo* und *in vitro*. Den Autoren gelang es weiterhin den proapoptotischen Effekt in den Kardiomyozyten durch eine siRNA vermittelte Degradierung von TLR2 in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte zu blockieren. *In vivo* führte eine Überexpression der LED-TM zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße und der HMGB1-Level, sowie eine therapeutische Intervention mit Anti-HMGB1 oder Anti-TLR2 zu einer Reduktion der apoptotischen Ereignisse und der myokardialen Schädigung gemessen am Troponinlevel. Somit konnte nicht nur gezeigt werden, dass die LED-TM im Rahmen myokardialer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion durch HMGB1-Bindung die pathologische Reaktion - zumindest teilweise - moduliert, sondern auch, dass diese Modulation der Beteiligung des Rezeptors TLR2 bedarf.

HMGB1 wird von stimulierten Kardiomyozyten aktiv gebildet und führt *in vivo* zu einer vergleichbaren Einschränkung der myokardialen Kontraktilität wie nach LPS Gabe (Xu et al. 2010). Der Grad der myokardialen Einschränkung ist dabei abhängig von der Konzentration des zirkulierenden HMGB1 und bereits innerhalb einer Stunde nach Applikation nachweisbar. Eine Behandlung mit einem HMGB1-Antagonisten oder Inhibitor führt zu einer vollständigen Erholung der myokardialen Leistung im LPS Modell. Xu und Kollegen vermuten weiterhin eine TLR4-abhängige Sekretion von HMGB1 in Kardiomyozyten. Andere *in vitro* Studien zeigen, dass eine Einschränkung der myokardialen Kontraktilität auf einen negativ inotropen Effekt durch HMGB1 zurückzuführen ist, der mit einem gestörten Kalziumflux einhergeht. Eine Vorbehandlung mit Anti-

TLR4 verbesserte die HMGB1 verursachten negativen Effekte der Kontraktilität *in vitro* (Tzeng et al. 2008).

Obwohl die kardiodepressiven Effekte von HMGB1 bekannt sind und es als Mediator in der Entstehung einer sepsis-assoziierten kardialen Depression fungiert, wurde der anti-inflammatorische und somit vermutlich kardioprotektive Effekt durch die LED-TM während einer septischen Kardiomyopathie, die dieses endogene Alarmin bindet, noch nie untersucht.

2 Ziele der Arbeit

Betrachtet man im Modell der endotoxämischen kardialen Dysfunktion die durch HMGB1 induzierten kardial depressiven Effekte (Xu et al. 2010) sowie die maladaptiven Effekte in Abwesenheit der LED-TM während myokardialer Ischämie und Reperfusion (Herzog et al. 2014), so liegt die Vermutung nahe, dass die LED-TM eine wesentliche Rolle in der Pathogenese einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion einnehmen könnte. Diese Effekte wären, zumindest teilweise, durch die Bindung von HMGB1 an die LED-TM vermittelt, welche die nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktion über die potenziellen Rezeptoren TLR2 und/oder TLR4 moduliert (Akira 2009).

Die zugrundeliegenden Hypothesen dieser Arbeit sind daher, dass:

- (1) ein Vorhandensein der LED-TM mit einem positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität verbunden ist.
- (2) ein Fehlen der LED-TM die Ausprägung einer kardialen Dysfunktion unterstützt.
- (3) die Verfügbarkeit der LED-TM die myokardiale Schädigung verringert.
- (4) ein Vorhandensein der LED-TM die systemische und/oder myokardiale Inflammonsantwort verringert.
- (5) die durch die LED-TM verursachten positiven Effekte vornehmlich durch die Modulation der Verfügbarkeit von freiem HMGB1, als kardiodepressiv wirkendem Mediator, vermittelt werden.
- (6) die zugrundeliegende pro-inflammatorisch wirkende Signalkaskade in Abhängigkeit der LED-TM im Myokard durch eine Beteiligung der Rezeptoren TLR2 und/oder TLR4 erfolgt.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass TM unter inflammatorischen Bedingungen innerhalb von 24 Stunden herabreguliert und durch Endozytose internalisiert werden kann, wurde dieser Zeitraum zur Untersuchung ausgewählt. Als kliniknahes Modell der Wirtsreaktion auf eine systemische Infektion wurde in diesem Zusammenhang ein polymikrobielles Sepsismodell im Modellorganismus Maus gewählt. LED-TM *Knockout* Tiere und Wildtypen wurden auf ihr Überleben, die Krankheitsschwere, die generelle und kardiale inflammatorische Stressantwort sowie die pathologischen Veränderungen am

Myokard untersucht. Die kardiomyozytäre Schädigung im Rahmen der Sepsis wurde weiterhin anhand des Markers Troponin I bestimmt. Zudem erfolgte die Bestimmung des frei verfügbaren HMGB1 nach Sepsis. Zum Nachweis der myokardialen Leistung wurden direkte intrakardiale Druck-Volumen-Messungen vorgenommen. Zusätzlich wurden primäre Kardiomyozyten aus den Mäusen gewonnen, um die inflammatorische Stressantwort und die molekularen Mechanismen in Abhängigkeit von der LED-TM zu untersuchen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeitshypothesen sollen ein tieferes Verständnis der molekularen Pathogenese der septischen Kardiomyopathie und damit einhergehend Perspektiven für eine verbesserte Diagnose und kausale Therapie dieser schweren Organdysfunktion im Rahmen einer septischen Erkrankung ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse

Alle Tierexperimente wurden durch die zuständige Behörde (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz) unter der Registrierungsnummer 02/037-11 genehmigt. Mäuse, denen durch eine Deletion die LED-TM fehlt ($TM^{LeD/LeD}$), wurden durch Ed Conway generiert (Conway et al. 2002) und mehr als 10 Generationen auf den C57BL/6-J Mausstamm zurück gekreuzt. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus bei einer Raumtemperatur von $23\pm 1^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 30 bis 60% gehalten, wobei sie *ad libidum* Zugriff auf Standard-Nagerfutter und Wasser hatten. Für sämtliche Experimente wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere in einem Alter von 20 bis 25 Wochen verwendet. Als Kontrolle dienten vergleichbare Wildtypen (WT) desselben Alters und Geschlechts. Sämtliche Tiere hatten eine Adaptionszeit von mindestens 2 Tagen an die experimentellen Haltungsbedingungen von $28\pm 1^\circ\text{C}$.

3.2 Experimentelle Sepsis

Um einen septischen Insult auszulösen, wurde eine standardisierte und mikrobiologisch validierte humane Faeces-Suspension 1:4 in isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und mit Hilfe einer 21-gauge Kanüle gewichtsadaptiert ($2\text{ }\mu\text{L/g KG}$; Koloniebildende Einheiten (KbE)/ μL : Gram-positive 650 KbE, Gram-negative 3200 KbE), in den Intraperitoneal-Raum appliziert. Die hieraus resultierende diffuse Peritonitis hatte eine systemische Inflamationsreaktion im Versuchstier zur Folge, die viele Eigenschaften einer humanen Sepsis widerspiegelt bei gleichzeitigem polymikrobiellen humanpathogenem Keimspektrum (peritoneale Kontamination und Infektion [PCI] nach Gonnert et al. 2011). Scheinbehandelte Tiere erhielten das gleiche Volumen isotonische Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Sämtliche Tiere erhielten nach Sepsisinduktion alle 4 h eine subkutane Volumensubstitution ($25\text{ }\mu\text{L/g KG}$) mit isotonischer Kochsalzlösung.

3.3 Überlebenszeitanalyse und Erhebung klinischer Krankheitsparameter

Im Rahmen einer Überlebenszeitanalyse für einen Beobachtungszeitraum von 24 h wurden die Tiere in einem engmaschigen 4-stündigen Intervall auf das Überleben und die Krankheitsschwere kontrolliert. Die Beurteilung der Krankheitsschwere erfolgte hierbei anhand des *Clinical Severity Scores* (modifiziert nach Gonnert et al. 2011, siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Bewertungsgrundlage zur Erhebung des *Clinical Severity Score* (CSS)

Grad	Ausprägung	Bewertungseinheit	Kriterien			
			spontane Aktivität	Reaktion auf Umweltreize	Körperhaltung	Symptome
1	Gesund [≤ 4 Punkte]	1 Punkt pro Kriterium	aktiv, stark	neugierig, schnell	normal	keine
2	Low-grade [5-8 Punkte]	2 Punkte pro Kriterium	weniger aktiv mit offensichtlichen Unterbrechungen	reduzierte Alarmbereitschaft, aber reaktionsfähig	leicht gekrümmt	Durchfall
3	Mid-grade [9-12 Punkte]	3 Punkte pro Kriterium	langsam, schläfrig, Schwierigkeiten beim Laufen	eingeschränkt und verspätet	deutlich gekrümmt	Konjunktivitis
4	High-grade [≥ 13 Punkte]	4 Punkte pro Kriterium	Lethargisch, keine Bewegungen	keine	stark gekrümmt	moribund

(modifiziert nach Gonnert et al. 2011)

3.4 Euthanasie, Blut- und Organentnahme, Plasmagewinnung, Bestimmung klinisch relevanter Schädigungsparameter

Die überlebenden Versuchstiere wurden zum Ende der Überlebenszeitanalyse (24 h nach PCI) bzw. unabhängig von der Überlebenszeitanalyse nach 6 und 12 h Sepsis in tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose (3,5%) narkotisiert und anschließend auf Schmerzfreiheit überprüft. Danach erfolgte eine finale Blutentnahme im retrobulbären Venenplexus mit Hilfe einer Kapillare. Das Blut wurde in Lithium-Heparin Monovetten (S-Monovette® 1,2 mL, Li-Heparin, Sarstedt, Deutschland) gesammelt. 20 µL von dem gewonnenen Vollblut wurden direkt zur Messung des Blutbildes an einem veterinärmedizinischen Blutbildautomaten (pocH-100-iv-Diff, Sysmex, Deutschland) verwendet. Das restliche Blut wurde für 10 min bei Raumtemperatur und 2000xg zentrifugiert und das so gewonnene Plasma für die weitere Verwendung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die quantitative Bestimmung von Organschädigungsparametern erfolgte mit dem gewonnenen Plasma an einem Analysegerät zur klinischen Labordiagnostik (Fuji Dri-Chem 3500i, Fujifilm, Deutschland) mit den entsprechenden analytischen Slides (siehe Tabelle 3) gemäß der Herstellerempfehlungen.

Tabelle 3: Bezeichnung und Bestellinformation der verwendeten Fuji-DriChem-Slides

Bezeichnung	Bestellnummer (Firma: scil animal care company GmbH)	klinischer Parameter
LDH-PIII	1514	Plasma/Serum Test für Laktatdehydrogenase
GLU-PIII	1510	Plasma/Serum Test für Glukose
ALP-PIII	1503	Plasma/Serum Test für alkalische Phosphatase
GOT/AST-PIII	1511	Plasma/Serum Test für Aspartat-Aminotransferase
GPT/ALT-PIII	1512	Plasma/Serum Test für Alanin-Aminotransferase
CPK-PIII	1507	Plasma/Serum Test für Kreatinkinase
CKMB-PIII	1559	Plasma/Serum Test für Kreatinkinase Isozym MB
CRE-PIII	1508	Plasma/Serum Test für Kreatinin

Direkt im Anschluss an die Blutentnahme erfolgten die Eröffnung des Abdomens und des Thorax sowie das zügige Herauspräparieren von Herz, Lunge, Leber, Nieren und Milz. Die Organe wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom, Deutschland) gespült und entweder, für eine spätere RNA- oder Proteinextraktion, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder, für eine spätere histologische Untersuchung, in 5%iger Formaldehyd-Lösung (Otto Fischar GmbH, Deutschland) für 24 h fixiert.

3.5 Beurteilung der Herzfunktion mittels intrakardialer

Konduktanzkatheter-Messung

Unter Zuhilfenahme eines Druck-Volumen-Katheters erfolgte die Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve zur direkten intrakardialen Evaluation der myokardialen Funktion 12 h nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis. Die Messung mit dem Konduktanzkatheter stellt eine Vielzahl von volumenabhängigen und –unabhängigen Parametern zur Analyse zur Verfügung und gilt daher als Goldstandard der Hämodynamik- und kardialen Funktionsmessung (Burkhoff et al. 2005, Pacher et al. 2008). Alle operativen Eingriffe und Messungen wurden von Herrn Dr. Bernadin Ndongson-Dongmo (Institut für Molekulare Zellbiologie der Friedrich-Schiller-

Universität Jena) durchgeführt, um Fehlmessungen durch einen erfahrenen Untersucher auszuschließen. Die Tiere wurden mittels Isofluran-Inhalationsnarkose (1,5%) anästhesiert, in Rückenlage auf einer beheizten Unterlage positioniert, Hals- und Bauchpartie rasiert und anschließend chirurgisch tracheotomiert, um eine gewichtsadaptierte (Ndongson-Dongmo 2015) mechanische Ventilation zu gewährleisten (MiniVent Model 845, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, Deutschland). Anschließend wurde durch die rechte Arteria carotis ein 1.4F Mikrokonduktanz-Druck-Volumen-Katheter (Model SPR-839, Millar Instruments Inc, USA) bei geschlossenem Thorax im linken Ventrikel positioniert (Pacher et al. 2008). Die kontinuierliche Aufzeichnung der Druck-Volumen-Kurven erfolgte durch ein angeschlossenes Power Lab System bei einem konstanten Strom von 30 mA und einer Frequenz von 2 kHz (MillarMPVS/Power Lab, ADInstruments Ltd., UK). Nach einer 10-minütigen Stabilisierungszeit wurde für die Aufzeichnung der basalen Hämodynamik die Ventilation kurzfristig abgestellt, so dass Apnoe-Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet wurden, die störungsfrei von Druckartefakten durch die Beatmung waren. Nach Aufzeichnung der initialen Hämodynamik wurde der obere Abdominalbereich eröffnet um die Vena cava inferior freizulegen. Anschließend erfolgte die kurzfristige Okklusion der Vena cava inferior bei gleichzeitiger Apnoe. Durch die so bewirkte Reduktion der Vorlast fiel der Druck im linken Ventrikel bei gleichzeitiger Volumenreduktion, so dass sich die aufgezeichneten Druck-Volumen-Kurven graduell verringerten und nach links verschoben. Die Steigung der Verbindungslinie der endsystolischen Kurvenpunkte gilt als anerkannter Parameter für die linksventrikuläre Kontraktilität, da er unempfindlich gegenüber Vor- und Nachlast ist (Kass et al. 1989, Burkhoff et al. 2005, Pacher et al. 2008). Zum Abschluss der Messung erfolgte eine Injektion von 10 µL einer 10%-igen hypertonen Kochsalzlösung in die linke Vena jugularis. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nahm durch den Einstrom der hypertonen Kochsalzlösung rapide zu (Druck-Volumen-Kurven wandern nach rechts), obwohl die Drucksignalamplitude nahezu unverändert blieb. Dieses veränderte Konduktanzsignal ermöglichte die Korrektur der sogenannten parallelen Konduktanz, also dem Volumensignal welches auf der Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes (hauptsächlich Herzgewebe) und nicht auf der tatsächlichen Leitfähigkeit des Blutes beruht. Das erhöhte Konduktanzsignal ist in der Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel begründet und ermöglichte so in der Analysesoftware (PVAN 3.3, Millar Instruments Inc, USA) die Berechnung des realen Blutvolumens (Pacher et al. 2008).

3.6 Isolation primärer Kardiomyozytenkulturen

Primäre Kardiomyozyten sind sowohl physiologisch als auch funktional den kommerziell verfügbaren kardialen Zelllinien vorzuziehen, da sie die *in vivo* Funktionalität und Integrität von Kardiomyozyten besser abbilden und Einblicke in die zelluläre und subzelluläre Physiologie ermöglichen (Louch et al. 2011, Lemm 2015). Die TM^{LeD/LeD} und die entsprechenden WT-Mäuse dienten daher als Ressource zur Isolation von primären ventrikulären Kardiomyozyten für nachfolgende *in vitro* Untersuchungen.

3.6.1 Neonatale Kardiomyozytenkulturen

Neonatale Kardiomyozyten wurden durch enzymatischen Verdau (Kollagenase Typ II, 270 U/mg, Worthington, USA) entsprechend der beschriebenen Protokolle (Maass und Buvoli 2007, Louch et al. 2011) mit einigen Modifikationen gewonnen und kultiviert. Hierfür wurden 15 bis 30 neugeborene Mäuse (1-3 Tage) mit Hilfe einer scharfen Schere dekapitiert, die Herzen zügig entnommen und in gekühltem Entnahmepuffer (120 mM NaCl; 20 mM HEPES; 1 mM NaH₂PO₄; 5,5 mM Glukose; 5,4 mM KCl; 0,83 mM MgSO₄; pH 7,4) gelagert. Die Ventrikel der Herzen wurden separiert und kleingeschnitten, um anschließend in den kollagenasehaltigen Verdaupuffer (Entnahmepuffer + 100 U/mL Kollagenase; 0,88 mg/mL Pankreatin [Sigma-Aldrich]) transferiert zu werden. Die vollständige Dissoziation des Gewebes erfolgte in 4 bis maximal 6 Verdauschritten von jeweils 10 min bei 37°C unter vorsichtigem Rühren (45 Umdrehungen/min) in einem Rührsystem (CELLSPIN Spinnersystem zur Zellkultivierung, IBS GmbH, Deutschland) im Inkubator (Hera Cell 150, Thermo Scientific, Deutschland). Die so erhaltenen Einzelzellen im Überstand wurden nach jedem Verdauschritt abgenommen und in Serum (Newborn calf Serum, PAA, Großbritannien) übergeben, um einen weiteren Verdau zu stoppen. Alle gewonnenen Zellen wurden bei 80xg für 6 min zentrifugiert und in Plating-Medium (68 mL DMEM, 17 mL M 199, 10 mL Pferdeserum, 5 mL fetales Kälberserum, 2 mM GlutaMAX™, 1% Penicillin/Streptomycin [10.000 U/mL]) resuspendiert. Da Myozyten weniger adhärent an Plastikoberflächen anwachsen als andere Zelltypen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, wurde die Zellsuspension für 1 h in einer unbeschichteten Petrischale im Inkubator bei 37°C inkubiert. Der Myozytenreiche Überstand wurde anschließend abgenommen, die totale Zellzahl der lebenden Zellen durch Trypanblaufärbung bestimmt und die Zellen anschließend mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in Kollagen vorbeschichtete ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen I, BD Biosciences) Petrischalen eingesät und für die ersten 24 h in Plating-Medium kultiviert.

Danach folgte ein Mediumwechsel zu einem Serum-reduzierterem Maintenance-Medium (90 mL DMEM, 10 mL M 199, 1 mL fetales Kälberserum, 2 mM Gluta-MAX™, 1% Penicillin/ Streptomycin [10.000 U/mL]) und nach insgesamt 72 h in Kultur, bildeten die neonatalen Myozyten eine etwa 70-80% konfluente Zellschicht aus synchron schlagenden Kardiomyozyten. Die Reinheit der Kulturen (85-90% Kardiomyozyten) wurde mittels α -Actinin-Färbung (Mouse monoclonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) antibody, Sigma-Aldrich) verifiziert und die Zellen zu dem indizierten Zeitpunkt für Experimente genutzt.

3.6.2 Adulte Kardiomyozytenkulturen

Adulte Kardiomyozyten wurden durch enzymatischen Verdau (Kollagenase Typ II, 310 U/mg, Worthington, USA) entsprechend der beschriebenen Protokolle (Louch et al. 2011) mit einigen Modifikationen gewonnen und kultiviert (Ndongson-Dongmo 2015). Die Präparation, Kanülierung und Perfusion des Herzens wurde dabei von Herrn Dr. Bernadin Ndongson-Dongmo (Institut für Molekulare Zellbiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere zunächst in tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose (3,5%) anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Daraufhin wurde das Herz zügig heraus präpariert und in kalziumfreien Perfusionspuffer (120,4 mM NaCl; 14,7 mM KCl; 0,6 mM KH₂PO₄; 0,6 NaH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 4,6 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES; 30 mM Taurine; 10 mM Butanedione monoxime [BDM]; pH 7,4) gelagert. Die Aorta wurde kanüliert und die Kanüle mit Hilfe eines umliegenden Knotens oberhalb des Abgangs der Koronararterien fixiert, so dass das Perfusat ungehindert durch die Koronararterien fließen konnte um einen gleichmäßigen Verdau zu gewährleisten (Louch et al. 2011). Nach initial 4-minütiger Perfusion (konstanter Fluss von 3 mL/min) mit Perfusionspuffer wurde der Verdaupuffer (Perfusionspuffer + 1 mg/mL Kollagenase; 12,5 μ M Kalzium) für weitere 12 min angeschlossen. Nach diesem Verdauschritt wurde das Herz von der Kanüle geschnitten und in 2,5 mL des Verdaupuffers in kleine Stücke geschnitten und vorsichtig mit einer Pipette für 3 min resuspendiert, um die Zellen mechanisch zu vereinzeln. Danach wurden die Zellen in eine BSA-haltige Lösung (Perfusionspuffer + 1 mg/mL BSA; graduell ansteigender Kalziumgehalt beginnend bei 12,5 μ M) in ein Falcon überführt und durch Gravitationskraft für 5 min darin sedimentiert und anschließend zentrifugiert (17xg für 3 min). Dieser Schritt der Anreicherung von Kardiomyozyten durch Gravitation bei gleichzeitiger gradueller Anreicherung des intrazellulären Kalziumgehalts auf eine finale physiologi-

sche Konzentration von 1,2 mM wurde insgesamt 5-mal durchgeführt (12,5 μ M; 50 μ M; 200 μ M; 600 μ M und 1,2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in BSA-haltigem Perfusionspuffer). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in Plating-Medium (MEM 0,85 g/L NaHCO_3 , 1 mg/mL BSA, 1% Penicillin/ Streptomycin [10.000 U/mL], 2 mM Glutamin, 10 mM BDM) resuspendiert und in Laminin vorbeschichtete (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mouse Laminin, BD Biosciences) Petrischalen mit einer Dichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro Well eingesät. Nach etwa 90 min im Inkubator erfolgte ein Mediumwechsel zu einem BDM-freien Maintenance-Medium, in dem die Zellen dann für 15 h im Inkubator aufbewahrt wurden, bevor sie für Experimente genutzt wurden. Die Reinheit der Kulturen (100% Kardiomyozyten) wurde mittels α -Actinin-Färbung (Mouse monoclonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) antibody, Sigma-Aldrich) verifiziert und die Zellen zu dem indizierten Zeitpunkt für Experimente genutzt.

3.7 *in vitro* Stimulationen

Um die akuten Veränderungen der zellulären Immunantwort von neonatalen Kardiomyozyten durch die Analyse der Genexpressionsänderungen mit Hilfe der qRT-PCR (siehe Abschnitt 3.9) im Rahmen des systemischen Insults isoliert von anderen Organsystemen optimal abbilden zu können, erfolgte eine 6-stündige Stimulation mit einem Zytokinmix (ZM, Tabelle 4). Der ZM bildet das klinische Bild von septischen Plasma weitgehend ab und initiiert ein gut vergleichbares Muster in der Regulation der myokardialen Immunantwort, verglichen mit dem von Herzen nach PCI (Lemm 2015). Der ZM besteht aus LPS, einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, und Zytokinen, die Schädigungsassoziierte molekulare Muster, ausgehend von der gestörten Immunantwort im Rahmen des septischen Krankheitsgeschehens, verursachen. Um weiterhin die direkten Effekte von HMGB1 auf Kardiomyozyten zu untersuchen, erfolgte außerdem die vergleichende Stimulation von adulten Kardiomyozyten mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HMGB1 (Disulfide-HMGB1, LPS-free, HMGBiotech, gelöst in Medium) und/oder 100 ng/mL LPS (LPS von *Escherichia coli* Serotyp O111:B4, Sigma-Aldrich, gelöst in Medium mit 1% Mausserum). Die sich anschließende quantitative Bestimmung der in den Überstand frei gesetzten Zytokine mittels *Cytometric Bead Array* (siehe Abschnitt 3.10.1) während der zellulären Inflammationsantwort, ermöglichte erste Aussagen über molekulare Wirkungsmechanismen von HMGB1 in Abhängigkeit von der LED-TM im Myokard.

Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur Stimulation von neonatalen Kardiomyozyten

Bezeichnung	Firma (Bestellnummer)	Konzentration (ng/mL)
TNF α	Hiss/Novitec (810167-A)	50
IL-1 β	Hiss/Novitec (810079-A)	10
IL-6	Hiss/Novitec (810098-A)	50
IFN- γ	Hiss/Novitec (810752-A)	10
LPS (E. coli, O111:B4)	Sigma-Aldrich (L2630)	100

3.8 Etablierung eines geeigneten Protokolls zur *in vitro* cDNA/siRNA Transfektion

Die liposomale Transfektion von primären Kardiomyozyten bietet eine vergleichsweise schnelle, günstige und mit geringer Zytotoxizität verbundene Methode zum erfolgreichen Transfer von Plasmid-DNA und *small interfering* RNA (siRNA) ins Zytoplasma und den Nukleus. Die Transfektionseffizienz in primären Kardiomyozyten verglichen mit immortalisierten Zelllinien oder anderen Transfermethoden, wie adenovirale Transduktion, wird allerdings als eher gering beschrieben (Lan et al. 2009, Louch et al. 2011). Entsprechende Transfektionsreagenzien sind in einer Vielzahl kommerziell verfügbar und die im Rahmen dieser Arbeit ausgetesteten Reagenzien sind Tabelle 5 zu entnehmen. Während vollständig differenzierte adulte Kardiomyozyten in der Literatur als schlecht transfizierbar durch liposomale Transfektionsreagenzien beschrieben werden (Louch et al. 2011), sind neonatale Kardiomyozyten mit dieser Methode erfolgreich transfizierbar (Lan et al. 2009). Daher erfolgte die Etablierung einer geeigneten Transfektionsstrategie für eine optimale Transfektionseffizienz im Zellkulturmodell der neonatalen Kardiomyozyten gewonnen aus WT-Mäusen. Plasmid-DNA, die entweder vollständiges humanes Thrombomodulin (pcDNA-hTM) oder humanes Thrombomodulin ohne LED-TM (pcDNA-hTM- Δ LLD) kodiert, wurde nach zuvor beschriebenen Protokoll (Herzog et al. 2014) durch die Arbeitsgruppe von G. Theilmeier generiert und für die hier durchgeführten Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt. siRNA gegen Maus TLR2, Maus TLR4 und *Non-targeting* siRNA zur Kontrolle wurden von Dharmacon bezogen (ON-TARGETplus Set siRNA, Tabelle 6). siRNA und/oder pcDNA wurde gemäß der Herstellerempfehlungen mit dem jeweiligen Reagenz in serumfreien Verdünnungsmedien zusammengeführt (siehe Tabelle 5) und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die siRNA/pcDNA-Liposomen-Komplexbildung zu gewährleisten und anschließend auf die Zellen mit normalen Maintenance-Medium gegeben (X-treme Gene 9 DNA) bzw. auf die Zellen in 1 mL serumfreien Maintenance Me-

dium gegeben (Reagenzien von Synvolux Therapeutics; weitere 2 mL reguläres Maintenance Medium nach 4 h Inkubation mit Komplex zugesetzt). Die Inkubationszeiten mit dem jeweiligen Transfektionskomplex sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Verwendeten Reagenzien zur Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten

Bezeichnung Reagenz (Firma)	Inkubationszeit	Ratio Reagenz (µL) : Konzentration pcDNA oder siRNA (µg)
X-treme Gene 9 DNA	3 Tage	10 µL [+ 100 µL OptiMEM] : 2 µg pcDNA
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Invitrogen)	24 Stunden	5 µL [+ 250 µL OptiMEM]: 1 µg siRNA [+ 250 µL OptiMEM]
X-treme Gene 9 DNA	3 Tage	10 µL [+ 100 µL OptiMEM] : 2 µg pcDNA
Saint Red (Synvolux Therapeutics)	24 Stunden	20 µL [+ 80 µL HBS] : 1 µg siRNA [+ 100 µL HBS]
Saint-Mix (Synvolux Therapeutics)	3 Tage	20 µL [+ 80 µL HBS]: 1 µg pcDNA + 1 µg siRNA [+ 100 µL HBS]

Tabelle 6: Antisense-Oligonukleotidsequenz der verwendeten siRNA für Transfektion

Oligo	Sequenz (5' – 3')	Zielsequenz
siRNA J-047487-05	GCAUAGAGGUAGUCCUAA	TLR4 Maus (NM_021297)
siRNA J-047487-06	GAGUUCAGGUUACAUAUA	
siRNA J-047487-07	GGAAUUGUAUCGCCUUCUU	
siRNA J-047487-08	UGACGAACCUAGUACAUGU	
siRNA J-062838-17	AGUCAGACGUAGUGAGCGA	TLR2 Maus (NM_011905)
siRNA J-062838-18	UCCUGAAGCUGUUGCGUUA	
siRNA J-062838-19	CUGGAGAAGGUGAAGCGAA	
siRNA J-062838-20	CUGAGAAUGAUGUGGGCGU	

Für die Analyse der Transfektionseffizienz unter Berücksichtigung zytotoxischer Effekte erfolgte anschließend die Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Konzentration im Zellkulturüberstand gemäß der Herstellerempfehlungen (Cytotoxicity Detection Kit PLUS, Roche) und die relative Quantifizierung der Expressionsänderungen mit Hilfe der qRT-PCR und Western Blot aus den Zelllysaten.

Nach Bestimmung eines geeigneten Transfektionsprotokolls erfolgte eine sich anschließende experimentelle Stimulation der transfizierten WT-Kardiomyozyten mit ZM gemäß Abschnitt 3.7 für einen Zeitraum von 6 h.

3.9 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

RNA wurde entweder aus dem Herzgewebe (15-30 mg Gewebe) oder aus den ventrikulären Kardiomyozyten ($\geq 1 \cdot 10^6$ Zellen) mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN GmbH, Deutschland) gemäß der Herstellerempfehlungen extrahiert. Das zu lysierende Herzgewebe wurde zusammen mit dem im Kit erhältlichen Lysepuffer, dem zuvor 1% β -Mercaptoethanol hinzugefügt wurde, in ein Reagiergefäß übergeben und anschließend für 3 min bei 30 Hz im Qiagen TissueLyser (QIAGEN GmbH, Deutschland) homogenisiert. Die Kardiomyozyten wurden direkt in der Kulturschale durch Zugabe des Lysepuffers, ohne maschinellen Aufschluss, lysiert und mit einer Pipette resuspendiert und dadurch homogenisiert. Die Extraktion der RNA erfolgte automatisiert im QIAcube (QIAGEN GmbH, Deutschland) und die isolierte RNA wurde in 30 μ L RNase-freiem Wasser eluiert. Nach der photospektrometrischen Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop® ND-2000c (PepLab, Deutschland) und der Qualitätskontrolle der RNA mittels des Experion™ RNA StdSens Analysis Kit am Experion™ automatic electrophoresis system (BIO-RAD Laboratories, USA) gemäß den Herstellerempfehlungen, erfolgte die cDNA Synthese. Hierfür wurde 1 μ g RNA mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Deutschland) entsprechend der Herstellerempfehlung in cDNA umgeschrieben und anschließend davon 25 ng pro Probe für eine Reaktion in der qRT-PCR eingesetzt. Zur qRT-PCR wurden weiterhin pro Reaktion 10 μ L vom DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Brilliant II SybrGreen qPCR Master Mix (Stratagene Agilent Technologies, USA) sowie ein geeignetes Primer-Paar (4 pmol) gemäß Tabelle 7 verwendet. Alle qRT-PCR Ansätze wurden durch das automatisierte Liquid Handling System CAS-Robotics 1200 unter Verwendung der zugehörigen Steuerungssoftware Robotics 4 v4.9.1 (QIAGEN GmbH, Deutschland) pipettiert. Folgendes Temperaturprofil fand bei der qRT-PCR im Cyclex Corbett Rotor-Gene 6000 und der zugehörigen Software Rotor-Gene 6000 series Software 1.7 (QIAGEN GmbH, Deutschland) Anwendung: initiale Denaturierung und Enzymaktivierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 40-50 Zyklen, welche sich aus einer Denaturierungsphase (15 s bei 95°C), Annealingphase (30 s bei 59-62°C) und Elongationsphase (30 s bei 72°C) zusammensetzten. Abschließend fand eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate mit einer schrittweisen Temperaturerhöhung um 0,5°C alle 3 s im Bereich von 72-95°C statt. Zur Effizienzbestimmung des jeweiligen Primer-Paares wurde eine Standardreihe bestehend aus mindestens 5 seriellen Verdünnungen des PCR-Produkts mit demselben Temperaturprofil angewandt. Die relative mRNA-Expressions-Änderung nach Pfaffl wurde für

jedes Zielgen berechnet (Pfaffl 2001) und dazu gegen ein nicht-reguliertes Referenzgen normalisiert. Die jeweiligen Referenzgene mit der höchsten Stabilität wurden mithilfe des frei verfügbaren Excel Add-In „NormFinder“ v0.953 (Andersen et al. 2004) kalkuliert. Die nach Pfaffl ermittelten *Ratios* wurden anschließend \log_2 -transformiert, so dass eine Hochregulation mit einem positiven Vorzeichen und eine Herabregulation mit einem negativen Vorzeichen belegt ist und beide Regulationen äquivalente Bereiche auf einer metrischen Skala einnehmen.

Tabelle 7: Oligoname, Sequenz (5′-3′) und cDNA-Evidenzgrundlage der verwendeten Primer für qRT-PCR

Oligo	Sequenz (5′ – 3′)	cDNA-Evidenz
iNOS_forward	TCAACTGCAAGAGAACGGAGA	NM_010927
iNOS_reverse	TCCTCTTTCAGGTCACTTTGGT	
MMP-9_forward	AACACCACCGAGCTATCCAC	NM_013599
MMP-9_reverse	CCTGAACCATAACGCACAGA	
IL-1 β _forward	GAAGAGCCCATCCTCTGTGA	NM_008361
IL-1 β _reverse	TTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
IL-6_forward	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	NM_031168
IL-6_reverse	CATTGGAAATTGGGGTAGGA	
IL-10_forward	ATGGTGTCTTTCAATTGCTCT	NM_010548
IL-10_reverse	AGGATCTCCCTGGTTTCTCTTC	
TNF α _forward	GTCTACTGAACTTCGGGGTGAT	NM_013693
TNF α _reverse	ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG	
MCP-1_forward	AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTAG	NM_011333
MCP-1_reverse	AATGTATGTCTGGACCCATTCC	
TLR2_forward	ACAAGCGGGACTTCGTT	NM_011905
TLR2_reverse	TCGTACTIONGCACCACTCG	
TLR4_forward	AGGAGTGCCCCGCTTTCACCT	NM_021297
TLR4_reverse	ACCTTCCGGCTCTTGTGGAAGCC	
MyD88_forward	AGTCTCCCCTCAGTGTCTGG	NM_010851
MyD88_reverse	CACTTGACCCAGGTTGCTTT	
NfkB_forward	AACTATGTGGGGCCTGCAAA	NM_008689
NfkB_reverse	GTTTGCAAAGCCAACCACCA	
hTM_forward	CGATGTCATTTCTTGCTACTG	NM_000361
hTM_reverse	TGGTGTGTTGTCTCCCGTA	
hTM-ALLD_forward	TTCCCCGCACCCCTGGCTGT	
hTM-ALLD_reverse	CAGCGCCTGGAAGTCCGCTC	
HMBS_forward	GAAATCATTGCTATGTCCACCA	NM_013551
HMBS_reverse	GCGTTTTCTAGCTCCTTGGTAA	
HPRT_forward	TGACACTGGCAAAACAATGCA	NM_013556
HPRT_reverse	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	
GUSB_forward	GAAACCCGCCGCATATTAC	NM_010368
GUSB_reverse	CCCCAGGTCTGCATCATATT	

3.10 Proteinbiochemische/Immunbiologische Nachweismethoden

3.10.1 Zytokinbestimmung mittels *Cytometric Bead Array*

Zur quantitativen Bestimmung von inflammations-assoziierten Zytokinen im Plasma, Proteinlysaten des Herzgewebes (siehe Abschnitt 3.10.3) oder Zellkulturüberstand wurde ein kommerziell verfügbarer BDTM Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit (CBA) entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Partikel-basiertes Immunoassay zur Detektion von löslichen Bestandteilen mit dem Funktionsprinzip eines ELISA. Der CBA bedient sich jedoch dabei 6 Partikelpopulationen (sogenannten Beads), die nach Inkubation mit einem Fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper ein spezifisches Fluoreszenzsignal hervorrufen. Diese 6 Partikel sind jeweils mit einem spezifischen Antikörper für IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF α und IL-12p70 vorbeschichtet, so dass es möglich ist, diese 6 Proteine gleichzeitig in einer Probe zu quantifizieren. Die spezifischen Partikel binden an das Zielprotein aus der Probe und das Fluoreszenzsignal wurde nach Zugabe der Phycoerythrin-konjugierten sekundären Antikörper mit Hilfe eines Flow Cytometers (BD FACSCaliburTM) und der zugehörigen Software BD CellQuest Pro bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 576 und 670 nm detektiert. Die Konzentration des jeweiligen Zielproteins wurde anhand einer Standardkurve und der zugehörigen Auswertesoftware FCAP Array v1.0.1 ermittelt.

3.10.2 Quantitative Bestimmung von kardialem Troponin I und HMGB-1

Zusätzlich zu den klinisch-chemisch bestimmten Parametern erfolgte die quantitative Bestimmung von weiteren mit Organschädigung assoziierten Parametern aus dem gewonnenen Plasma der Versuchstiere unter Verwendung entsprechender kommerziell verfügbarer ELISA-Kits gemäß den Herstellerempfehlungen (cardiales Troponin I Typ 3 [USCN Life Sciences] oder HMGB1 [IBL international]). Dabei wurde die Mikrotiter-Platte mit einem spezifischen Antikörper vorbeschichtet, so dass das in der Probe befindliche Zielprotein daran bindet. Anschließend wurde das zu detektierende gebundene Zielprotein mit einem spezifischen Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert. Durch Zugabe von Tetramethylbenzidin-Substrat erfolgte ein optisch messbarer Farbumschlag während der Enzym-Substrat-Reaktion. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure beendet und der Farbumschlag spektrophotometrisch bei 450 nm vermessen (ThermoMax Microplate Reader mit Software SoftMax Pro

3.0, MWG Biotech, Deutschland) und die Konzentrationen des enthaltenen Zielproteins anschließend anhand einer Standardkurve ermittelt.

3.10.3 SDS-PAGE und Western Blotting

Proteine wurden entweder aus dem Herzgewebe (30-70 mg Gewebe) oder aus den Kardiomyozyten ($\geq 1 \cdot 10^6$ Zellen) mit Hilfe des Proteinlysepuffers (10mM Tris, 250 mM Saccharose, 1mM EDTA, 1% Phosphatase-Inhibitor, 1% Protease-Inhibitor, 1% Triton X-100, pH 7,5) isoliert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten gekühlt auf Eis. Der Proteinlysepuffer wurde gewichtsadaptiert zugegeben, d. h. 100 μ L Puffer pro 10 mg Herzgewebe bzw. 50 μ L Puffer pro Well Kardiomyozyten. Das zu lysierende Gewebe wurde zusammen mit dem Puffer in ein Reagiergefäß übergeben und anschließend für 4 min bei 50 Hz im Qiagen TissueLyser (QIAGEN GmbH, Deutschland) homogenisiert. Im Falle der Kardiomyozyten wurden diese direkt in der gekühlten Wellplatte nach Zugabe des Lysepuffers mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und anschließend mit einer Pipette kräftig resuspendiert und das Lysat dann vollständig in ein Reagiergefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis, unter regelmäßigem mechanischem Homogenisieren alle 10 min unter Zuhilfenahme eines Vortexer (Vortex-Genie2, Scientific Industries Inc., USA), wurde das Homogenat bei 900xg für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Proteingehalt im gewonnenen Überstand mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits (Sigma-Aldrich) gemäß dem Herstellerprotokoll bestimmt (spektrophotometrische Detektion bei 550 nm am ThermoMax Microplate Reader). Zur weiteren Probenaufarbeitung für einen Immunoblot gehörten die Zugabe von Lämmli-Puffer (150 mM Tris, 33% Glycerin, 25% β -Mercaptoethanol, 0,1 mg/mL Bromphenolblau, 5% SDS, pH 8,0) und das Erhitzen der Proben für 5 min bei 95°C oder 40°C. Die Proteine wurden mit einem 4-12%-igen Polyacrylamid-Gel (NuPAGE® Bis-Tris Gel, Invitrogen, Deutschland) entsprechend ihrer Größe während der SDS-Gelelektrophorese (XCellSureLock® Mini Gel Elektrophoresekommer und NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen, Deutschland) aufgetrennt und mittels Tank-Blot (XCell II™ Blot Modul und NuPAGE® Transfer Buffer, Invitrogen, Deutschland) auf eine PVDF-Membran (Roth, Deutschland) transferiert. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in TBS-Tween (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) mit 5% BSA oder Skim Milk (Sigma-Aldrich, Deutschland) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 8) bei einer Temperatur von 4°C über Nacht. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBS-Tween erfolgte

die Inkubation mit einem geeigneten HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Tabelle 8) für 1 h bei Raumtemperatur. Eine chemolumineszente Reaktion wurde durch Zugabe des HRP-Substrats (Immobilon Western HRP Substrat, Merck, Deutschland) bewirkt und Detektion des Signals mit dem LAS-3000 und der zugehörigen Software Image Reader LAS-3000 Lite (Fuji Photo Film Co. Ltd, Japan) sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung der Bandensignalstärken erfolgte mit ImageJ 1.49 (National Institutes of Health, USA) unter Normalisierung gegen eine Ladekontrolle (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [Gapdh]). Die sich ergebenden Änderungen in der Signalstärke wurden relativ in Bezug auf die entsprechende Kontrollgruppe betrachtet.

Tabelle 8: Bezeichnung, Firma, Bestellinformation und Applikation der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Firma (Ort)	Bestellnummer	Applikation
Phospho-Phospholamban (Ser16/Thr17) Antibody	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)	#8496	1:4 000 in BSA
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)	#2118	1:1 000 in Skim Milk
TLR 4 Antibody (25)	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)	sc-293072	1:200 in Skim Milk
Anti-Thrombomodulin	Abcam	ab6980	1:100 in BSA
Peroxidase-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research (Suffolk, Großbritannien)	715-035-150	1:2 000 in Skim Milk 1:10 000 in BSA
Peroxidase-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research (Suffolk, Großbritannien)	711-035-152	1:10 000 in BSA/Skim Milk

3.11 Histologie/Immunhistochemie

3.11.1 Immunhistochemische Färbung und (Fluoreszenz-) Mikroskopie

Nach Fixierung der Organe in 5%-iger Formaldehydlösung wurden sie in destilliertem Wasser für etwa 1 h gründlich gewaschen um anschließend im Histokinette-Automaten (Leica TP1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe schrittweise dehydriert und durch die sich anschließende Inkubationen mit Xylol (Roth, Deutschland) gefolgt von Paraffin (Merck, Deutschland) für die Einbettung vorbereitet zu werden. Die abschließende Einbettung der Organe in Paraffin erfolgte am Einbettautomat (Leica EG 1160, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland). Die Anfertigung der 5 µm dicken histologischen Schnitte aus den Präparaten erfolgte am Rotationsmikrotom (Leica RM2165, Leica Biosystems Nussloch

GmbH, Deutschland). Für sämtliche immunhistochemischen Färbungen wurden die so angerfertigten Organschnitte durch Behandlung mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wieder entparaffiniert und rehydriert.

3.11.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung von pathomorphologischen Veränderungen des Gewebes nach PCI wurde die routinemäßige Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte für 2 min in Hämalun (nach P. Mayer, Sigma-Aldrich) getaucht, direkt im Anschluss unter fließendem Leitungswasser gebläut und dann für 15 min in Eosin (Merck, Deutschland) inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser erfolgten dann wieder die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Einbetten mit Entellan®-Eindeckmedium (Merck, Deutschland). Die lichtmikroskopische Beurteilung und Dokumentation des Färberesultats erfolgte am Mikroskop Olympus Provis AX70 und der Kamera AxioCam MRC5 sowie der zugehörigen Software AxioVision ACRel. 4.5 (Zeiss, Deutschland).

3.11.3 TUNEL-Färbung

Zur Bestimmung von apoptotischen Ereignissen im Myokard wurde eine direkte TUNEL-Färbung (In Situ Cell Death Detection Kit, AP; Roche, Deutschland) an den Herzwegsschnitten entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte zuerst für 8 min bei 37°C mit 20 µg/mL Proteinase K (Roche, Deutschland) permeabilisiert und anschließend mehrfach in PBS gewaschen. Danach erfolgte an einigen Schnitten ein 10 minütiger DNase-Verdau (RNase free DNase Set, PreAnalytix, Schweiz), um DNA-Strangbrüche zu induzieren und dadurch als interne Positivkontrolle für das sich anschließende Färbeprotokoll zu fungieren. Sämtliche Schnitte wurden nochmals mehrfach in PBS gewaschen und dann mit einem Fluorescein markierten Enzym-Nukleotid-Gemisch (terminale desoxynukleotidyl-Transferase (TdT)/ Fluorescein dUTP) für 1 h bei 37°C inkubiert (TUNEL-Reaktion). Negativ-Kontrollen wurden lediglich mit Fluorescein dUTP inkubiert. Nach abschließendem mehrmaligen Waschen der Schnitte mit PBS wurden diese mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Eindeckmedium (DAPI Mounting Media, Dako, Deutschland) eingebettet und das Färbeergebnis simultan am konfokalen Laserscanningmikroskop LSM780 (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung adäquater Wellenlängen (DAPI: Ex. 405 nm/Em. 410-494; Fluorescein: Ex. 488 nm/Em. 515-565 nm) und der zugehörigen Software (ZEN 2012 SP1 (black edition) 64 bit, Zeiss, Deutschland) dokumentiert. Die Quantifi-

zierung aller apoptotischen Ereignisse erfolgte mit Hilfe des Particel-Analyzer Tools der frei verfügbaren Software ImageJ 1.49 (National Institute of Health, USA).

3.11.4 PMN-Färbung

Um die Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der inflammatorischen Reaktion in den Geweben nachzuweisen, wurden die Schnitte außerdem mit anti-Mouse PMN Serum (Rabbit anti-Mouse PMN, Accurate Chemical, USA) behandelt. Dieses Serum enthält sowohl granulozytenspezifische Agglutinine als auch spezifische Antikörper gegen die oberflächlichen Glykoproteine der neutrophilen Granulozyten der Maus (Alloantikörper) und eignet sich daher zur Immunfluoreszenzfärbung dieser Leukozyten (Verheugt et al. 1977). Hierzu wurden die Schnitte zuerst mit Hilfe eines Zitratpuffers (Retrieval-Puffer (pH 6,1), Dako; Deutschland) im Dampfgarer (MultiGourmet, Braun, Deutschland) für 20 min bei ca. 100°C permeabilisiert. Nach Abkühlung und mehrfachen Waschschritten in destilliertem Wasser und PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen in einer serumhaltigen Blockierungslösung (PBS mit 0,01% Triton-X 100, 5% Donkey Serum, 0,3 M Glycin) für 20 min bei 37°C. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Schnitte mit Rabbit Anti-mouse PMN (1:500 in PBS mit 0,01% Triton-X 100) über Nacht bei 4°C. Negativ-Kontrollen wurden lediglich in PBS mit 0,01% Triton-X 100 inkubiert. Danach erfolgte nach mehreren Waschschritten die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Cy3 Donkey Anti-Rabbit IgG, Jackson, 1:400 in PBS mit 0,01% Triton-X 100) für 20 min. Nach abschließendem mehrmaligen Waschen der Schnitte wurden diese mit DAPI-haltigem Eindeckmedium (DAPI Mounting Media, Dako, Deutschland) eingebettet und das Färbeergebnis simultan am konfokalen Laserscanningmikroskop LSM 780 (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung adäquater Wellenlängen (DAPI: Ex. 405 nm/Em. 410-530; Cy3: Ex. 514 nm/Em. 538-680 nm) und der zugehörigen Software (ZEN 2012 SP1 (black edition) 64 bit, Zeiss, Deutschland) dokumentiert. Die Quantifizierung der Neutrophilenzahl erfolgte an jeweils 3 randomisiert ausgewählten Bildausschnitten (Fläche von je 0,5 mm²) pro Schnitt mit Hilfe des Particel-Analyzer Tools der frei verfügbaren Software ImageJ 1.49 (National Institute of Health, USA).

3.12 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse in Tabellen oder Balkendiagrammen sind als Mittelwert ± Standardfehler (Standard error of the mean – SEM) gezeigt. Box-Plots zeigen den Median und die

25% bzw. 75% Perzentile mit Whiskers von Minimum zum Maximum. Sämtliche statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism version 6.01 für Windows (GraphPad Software, USA) durchgeführt. Zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde ein Log-Rang (Mantel-Cox) Test durchgeführt und die Überlebenszeitproportionen in Kaplan-Meier Kurven illustriert. Gruppenvergleiche wurden bei vorliegender Normalverteilung mit einer ein-/zweifaktoriellen Varianzanalyse (Analysis of Variances – ANOVA) und Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak oder Tukey vorgenommen. Nichtparametrische Gruppenvergleiche wurden mit Kruskal-Wallis mit Post-hoc Analyse nach Dunn vorgenommen. Im Falle von verbundenen Stichproben erfolgte eine zweifaktorielle ANOVA mit Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak oder Kruskal-Wallis mit Post-hoc Analyse nach Dunn, da aufgrund fehlender Werte weder ein Friedmann-Test noch eine ANOVA mit wiederholten Messungen möglich war. Nicht-normalverteilte unabhängige Parameterkorrelationen wurden nach Spearman vorgenommen. Unterschiede wurden als signifikant angenommen bei einem Signifikanzwert $p \leq 0,05$ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der LED-TM auf das Überleben und die Schwere der Organschädigung nach polymikrobieller Sepsis

4.1.1 Überlebenszeitanalyse

Die resultierende diffuse Peritonitis nach PCI hatte eine schwere systemische Inflammasreaktion im Versuchstier zur Folge, wobei der Kaplan-Meier Plot (Abbildung 2) ein signifikant verringertes Überleben der $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere mit 15% nach 24-stündiger Beobachtung verglichen mit dem 33,3%-igen Überleben der WT (Log-rank (Mantel-Cox) $p=0,0471$) zeigte. Darüber hinaus zeigten die $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere ein früher einsetzendes Versterben. Die Summe aller beobachteten Todesereignisse der WT erreichte dabei zu keinem Zeitpunkt die Mortalitätsrate der $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere. Weiterhin gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren, weder beim Vergleich von WT gegenüber $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren noch beim Vergleich innerhalb der Genotypen (Tabelle 9).

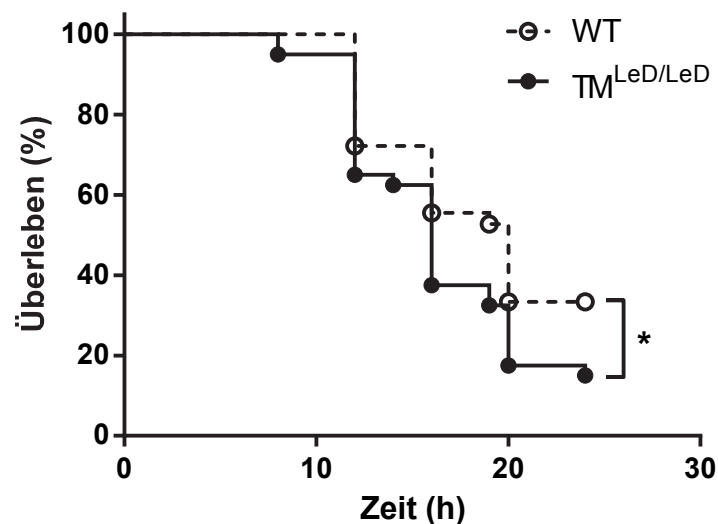


Abbildung 2: Überlebensanalyse nach polymikrobieller Sepsis (1 300 KbE Gram-positive + 6 400 KbE Gram-negative pro g KG i.p.)

Zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde ein Log-Rang (Mantel-Cox) Test durchgeführt und die Überlebenszeitproportionen in Kaplan-Meier Kurven illustriert. * $p<0,05$. $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere (n=40), WT (n=36).

Tabelle 9: Geschlechtsspezifische Gruppenvergleiche der Überlebensdynamik nach PCI anhand des Log-Rank (Mantel-Cox)

p [Log-Rang (Mantel-Cox)]	TM ^{LeD/LeD} ♀ (n=20)	TM ^{LeD/LeD} ♂ (n=20)	WT ♀ (n=20)	WT ♂ (n=16)
TM ^{LeD/LeD} ♀	-	0,8619	0,0978	0,5099
TM ^{LeD/LeD} ♂	0,8619	-	0,0539	0,3072
WT ♀	0,0978	0,0539	-	0,3752
WT ♂	0,5099	0,3072	0,3752	-

4.1.2 Clinical Severity Score

Während der Überlebenszeitanalyse erfolgte die Beurteilung der Krankheitsschwere mit Hilfe des CSS in einem engmaschigen Intervall alle 4 h. Anhand der Bewertung von äußerlich gut sichtbaren Krankheitszeichen, wie einer veränderten Körperhaltung, Aktivität, Reaktionsvermögen und dem Auftreten von Durchfall, wurde der Krankheitsverlauf eines jeden Versuchstiers individuell dokumentiert und in Krankheitsgrade von 1 (gesund) bis 4 (schwer krank) eingeteilt. Die Beurteilung der Krankheitsschwere anhand des klinischen Erscheinungsbildes der Versuchstiere offenbarte, dass beide Genotypen während des gesamten Beobachtungszeitraums Krankheitszeichen, verursacht durch die PCI, zeigten. Jedoch zeigten die TM^{LeD/LeD}-Tiere einen signifikant stärker ausgeprägten Krankheitsverlauf (Abbildung 3). Bereits 8 h nach PCI zeigte sich in beiden Genotypen eine überwiegend mittlere bis hochgradige Ausprägung der Krankheitsschwere, welche sich beginnend 12 h nach PCI in den TM^{LeD/LeD}-Tieren höher als in den WT-Tieren herausstellte ($p < 0,05$). Bereits 20 h nach Sepsis-Induktion zeigte sich eine Besserung der klinischen Symptomatik anhand des CSS und somit eine Abnahme der Morbidität in beiden Genotypen.

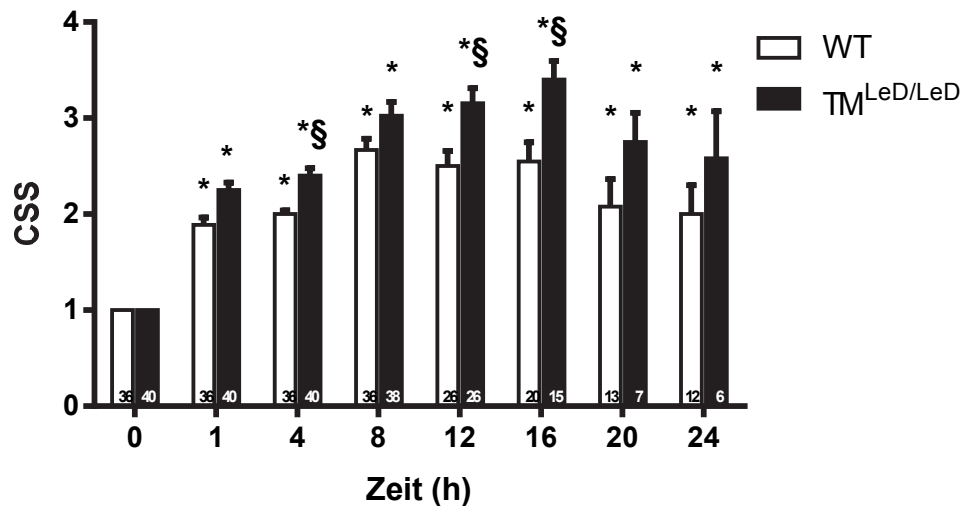


Abbildung 3: Bewertung der Krankheitsschwere anhand des CSS zu indizierten Zeitpunkten nach polymikrobieller Sepsis (2 μ L/g KG Faeces i.p.)

Clinical Severity Score (CSS) mit Krankheitsgraden von 1 (gesund) bis 4 (schwer krank). Mittelwert + SEM. Gruppengröße zu jedem Beobachtungszeitpunkt ist dem entsprechenden Balken zu entnehmen. *§ $p < 0,05$, * vs. Ausgangszeitpunkt; § vs. Wildtyp (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.1.3 Blutbild- und Organschädigungsparameter

Sämtliche erhobenen Parameter bezüglich der Konstitution, Hämatologie oder klinisch-chemischen Diagnostik erwiesen sich sowohl im Wildtyp als auch in den TM^{LeD/LeD} unter Kontrollbedingungen als unauffällig und innerhalb der bekannten Referenzbereiche vergleichbar (Everds 2004). In beiden Gruppen war eine deutliche und progressiv fortschreitende Abnahme des Körpergewichts und der Körpertemperatur nach septischem Insult messbar (Tabelle 10), so dass eine Hypothermie im Rahmen des septischen Krankheitsgeschehens nachweislich vorlag. Im Zuge der Inflamationsreaktion kam es vor allem zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl auf ca. 30% des Ausgangsniveaus verglichen mit den entsprechenden Kontrollen (Tabelle 10). Weiterhin sank die Thrombozytenzahl dramatisch ab, was sich in den TM^{LeD/LeD} verstärkt gegenüber den WT-Tieren darstellte ($p < 0,05$, Tabelle 10). Diese Veränderungen des Blutbildes waren bereits 6 h nach Sepsisinduktion messbar und kontinuierlich über den Untersuchungszeitraum von 24 h nachweisbar. Die zusätzlich erhobenen Parameter der klinischen Chemie zeigten weiterhin einen extensiven Anstieg des generellen Organschädigungsparameters Laktatdehydrogenase (LDH), der bei den TM^{LeD/LeD} bereits nach 6 h Inflamationsreaktion drastisch erhöhte Werte zeigte verglichen mit den Wildtypen, wohingegen die Wildtyp-Tiere erst nach 12 h vergleichbar hohe LDH-Werte mit den TM^{LeD/LeD} aufwiesen (Tabelle 10). Nach 24 h polymikrobieller Sepsis waren die

mittleren LDH-Konzentrationen in den $TM^{LeD/LeD}$ wieder in einem physiologischen Referenzbereich (Boehm et al. 2007). Weiterhin zeigte sich eine Reduktion in den Glukosewerten nach Sepsis, wobei auch diese Abnahme bereits 6 h nach PCI in den $TM^{LeD/LeD}$ signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollen war (Tabelle 10) und sich innerhalb von 24 h bereits wieder auf Normalwerte in beiden Genotypen stabilisiert hatte (Boehm et al. 2007). Hierin lassen sich die akuten Änderungen im Metabolismus während einer Sepsis in den Versuchstieren erkennen. Zudem traten auch andere Organschädigungsparameter, wie die Aspartat- (AST) oder auch Alanin-Aminotransferase (ALT) und das myokardiale Kreatin-Phosphokinase Isozym (CKMB) innerhalb der ersten 12 h nach dem Insult in beiden Genotypen erhöht im Vergleich zur Kontrolle in Erscheinung (Tabelle 10), die in beiden Genotypen sowohl einen Leberschaden anzeigten, als auch Hinweise auf eine potentielle myokardiale Schädigung im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis gaben. Der Plasma-Kreatiningehalt hingegen zeigte nur einen moderaten Anstieg im Rahmen des 24-stündigen Untersuchungszeitraumes, der im Vergleich zu üblichen Referenzwerten nur minimal war (Tabelle 10), so dass keine manifestierte Nierenschädigung anzunehmen ist. Die Alkalische Phosphatase (ALP) zeigte tendenziell eine Abnahme im Untersuchungszeitraum, die sich jedoch nur in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren 24 h nach PCI als signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrolle darstellte. Insgesamt zeigten sich demnach deutlich stärkere inflammations-assoziierte pathophysiologische Effekte, gemessen an klinisch relevanten diagnostischen Parametern, vor allem in der frühen Inflamationsreaktion in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren.

Tabelle 10: Parameter der Physiologie, Hämatologie und klinischen Chemie nach 6, 12 und 24 Stunden polymikrobieller Sepsis.

	WILD TYP						TM ^{LeD/LeD}					
	Kontrolle		6h PCI		24h PCI		Kontrolle		6h PCI		24h PCI	
	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n
KG	29,63 ± 0,44	16	28,69 ± 0,45	16	27,00 ± 0,91	4	28,20 ± 0,80	10	26,20 ± 0,84	10 §	25,00 ± 2,00	2
T	37,62 ± 0,22	16	35,06 ± 0,31	16 *	33,38 ± 2,30	4 *	37,81 ± 0,19	10	34,95 ± 0,60	10 *	34,70 ± 2,00	2
WBC	4,8 ± 0,4	8	1,9 ± 0,2	19 *	1,7 ± 0,2	11 *	6,5 ± 1,0	8	2,6 ± 0,3	18 *	3,1 ± 0,3	22 *
RBC	9,3 ± 0,2	8	10,9 ± 0,2	19 *	9,3 ± 0,2	11	9,5 ± 0,1	8	10,7 ± 0,3	18 *	9,8 ± 0,2	24
HGB	12,9 ± 0,3	8	15,2 ± 0,2	19 *	13,4 ± 0,2	11	13,6 ± 0,2	8	15,6 ± 0,4	18 *	14,1 ± 0,2	24
HCT	39,9 ± 0,9	8	46,1 ± 0,5	19 *	39,5 ± 0,7	11	41,2 ± 0,4	8	46,7 ± 1,2	18 *	43,0 ± 0,7	24
MCV	42,9 ± 0,3	8	42,2 ± 0,2	19	42,5 ± 0,2	11	43,4 ± 0,2	8	43,6 ± 0,2	18	44,1 ± 0,4	24
MCH	13,9 ± 0,1	8	13,9 ± 0,1	19	14,4 ± 0,1	11	14,4 ± 0,1	8	14,6 ± 0,2	18	14,5 ± 0,1	24 §
MCHC	32,4 ± 0,4	8	33,0 ± 0,3	19	33,9 ± 0,2	11	33,1 ± 0,3	8	33,5 ± 0,3	18	32,8 ± 0,1	24 §
PLT	1446,5 ± 79,9	8	726,3 ± 100,4	19 *	483,3 ± 62,8	11 *	1121,3 ± 39,9	8	272,4 ± 45,5	18 * §	304,9 ± 41,1	24 * §
LDH	345,0 ± 34,0	8	1443,7 ± 192,1	18 *	2117,8 ± 699,1	11 *	405,0 ± 52,3	8	4261,3 ± 809,7	18 * §	2462,3 ± 821,7	12 *
GLU	167,5 ± 18,0	8	97,8 ± 5,8	18	131,8 ± 13,6	11	151,0 ± 21,8	8	68,0 ± 6,7	19 *	43,7 ± 6,7	12 *
ALP	61,8 ± 10,0	8	80,8 ± 6,3	10	47,8 ± 3,3	10	124,1 ± 14,5	8	104,4 ± 8,6	10	114,7 ± 12,4	6
CRE	14,6 ± 1,6	8	15,3 ± 1,4	10	14,6 ± 3,8	11	15,6 ± 3,6	8	31,1 ± 3,7	10	28,2 ± 5,7	6
ALT	37,0 ± 5,5	5	51,7 ± 9,3	8	58,7 ± 5,1	9	25,4 ± 2,7	5	270,9 ± 223,3	8	65,1 ± 12,2	12
AST	123,0 ± 18,4	5	234,4 ± 40,6	8	297,8 ± 39,2	9	56,4 ± 5,3	5	454,5 ± 232,3	8 *	216,9 ± 33,4	12 *
AST/ALT	3,6 ± 0,5	5	4,4 ± 0,5	8	5,4 ± 0,8	9	2,2 ± 0,2	5	4,3 ± 0,7	8	3,8 ± 0,4	12
CPK	576,6 ± 99,0	5	1313,8 ± 276,5	8	1303,2 ± 267,1	9	276,6 ± 25,1	5	1511,8 ± 342,2	8 *	582,7 ± 72,8	12
CKMB	144,8 ± 26,3	5	246,9 ± 37,5	8	481,0 ± 114,9	9	85,8 ± 6,3	5	244,1 ± 41,9	8	256,0 ± 46,7	12
CKMB %	25,4 ± 2,1	5	22,0 ± 2,7	8	43,2 ± 11,8	9	31,8 ± 3,3	5	17,4 ± 2,0	8	44,3 ± 5,6	12

KG – Körpergewicht [g]; T – Körpertemperatur [°C]; WBC – Leukozytenzahl [$10^3/\mu\text{L}$]; RBC – Erythrozytenzahl [$10^3/\mu\text{L}$]; HGB – Hämoglobin [g/dL]; HCT – Hämatokrit [%]; MCV – Mittleres Zellvolumen Erythrozyten [fL]; MCH – durchschnittlicher Hämoglobingehalt pro Erythrozyt [pg]; MCHC – mittlere Hämoglobinkonzentration [g/dL]; PLT – Thrombozytenzahl [$10^3/\mu\text{L}$]; LDH – Laktat-dehydrogenase [U/L]; GLU – Glukose [mg/dL]; ALP – Alkalische Phosphatase [U/L]; CRE – Kreatinin [$\mu\text{mol/L}$]; ALT – Alanin-Aminotransferase [U/L]; AST – Aspartat-Aminotransferase [U/L]; CPK – Kreatin-Phosphokinase [U/L]; CKMB – myokardiales Kreatin-Phosphokinase Isozym [U/L]. Mittelwert ± SEM. * § p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. Wildtyp (Kruskall-Wallis, Dunn's Post-hoc).

4.2 Kontraktile Dysfunktion des Herzens nach Sepsis

Unter Zuhilfenahme eines Druck-Volumen-Katheters erfolgte die direkte intrakardiale Evaluation der myokardialen Funktion 12 h nach PCI. Dieser Zeitpunkt wurde aufgrund der ersten signifikant unterschiedlichen CSS-Beurteilung bei zugleich mittel- bis hochgradiger Krankheitssymptomatik gewählt. In diesen Messungen zeigte sich eine schwere Einschränkung der myokardialen Leistung nach PCI in beiden Genotypen. Der Verlust der LED-TM hatte unter Sham-Kontrollbedingungen keinen Einfluss auf die Parameter der Herzfunktion. Die Verbindungslinie der endsystolischen Kurvenpunkte entspricht der endsystolischen Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR = rote Linie, Abbildung 4) und gilt als anerkannter und bester Parameter der linksventrikulären Kontraktilität, da er unabhängig von Vor- und Nachlaständerungen ist. Hierbei zeigten sich deutliche Kontraktilitätseinschränkungen in beiden Genotypen 12 h nach polymikrobieller Sepsis (Abbildung 4A&B), wobei sich ein Trend für eine größere Reduktion in den $TM^{LeD/LeD}$ abzeichnete (Abbildung 4B, $p=0,0549$). Die Ejektionsfraktion (EF) als klassischer Parameter der systolischen Funktion in der klinischen Diagnostik zeigt eine signifikante Abnahme der Auswurfleistung bei den $TM^{LeD/LeD}$ (Abbildung 5A). Die isovolumetrischen Druckänderungen der frühen systolischen Herzfunktion (dp/dt max, Abbildung 5B) bestätigen die verringerten kontraktile Eigenschaften in den $TM^{LeD/LeD}$, wobei das signifikant erhöhte enddiastolische Volumen (V_{ed} , Abbildung 5C) eine deutliche dilatative Kardiomyopathie in den $TM^{LeD/LeD}$ indiziert. Die isovolumetrische Relaxationszeit als Maß der diastolischen Funktion zeigt ebenfalls eine signifikante Einschränkung in den $TM^{LeD/LeD}$ (Abbildung 5D). Insgesamt zeigten sich alle Parameter der Herzfunktion in den $TM^{LeD/LeD}$ stärker eingeschränkt.

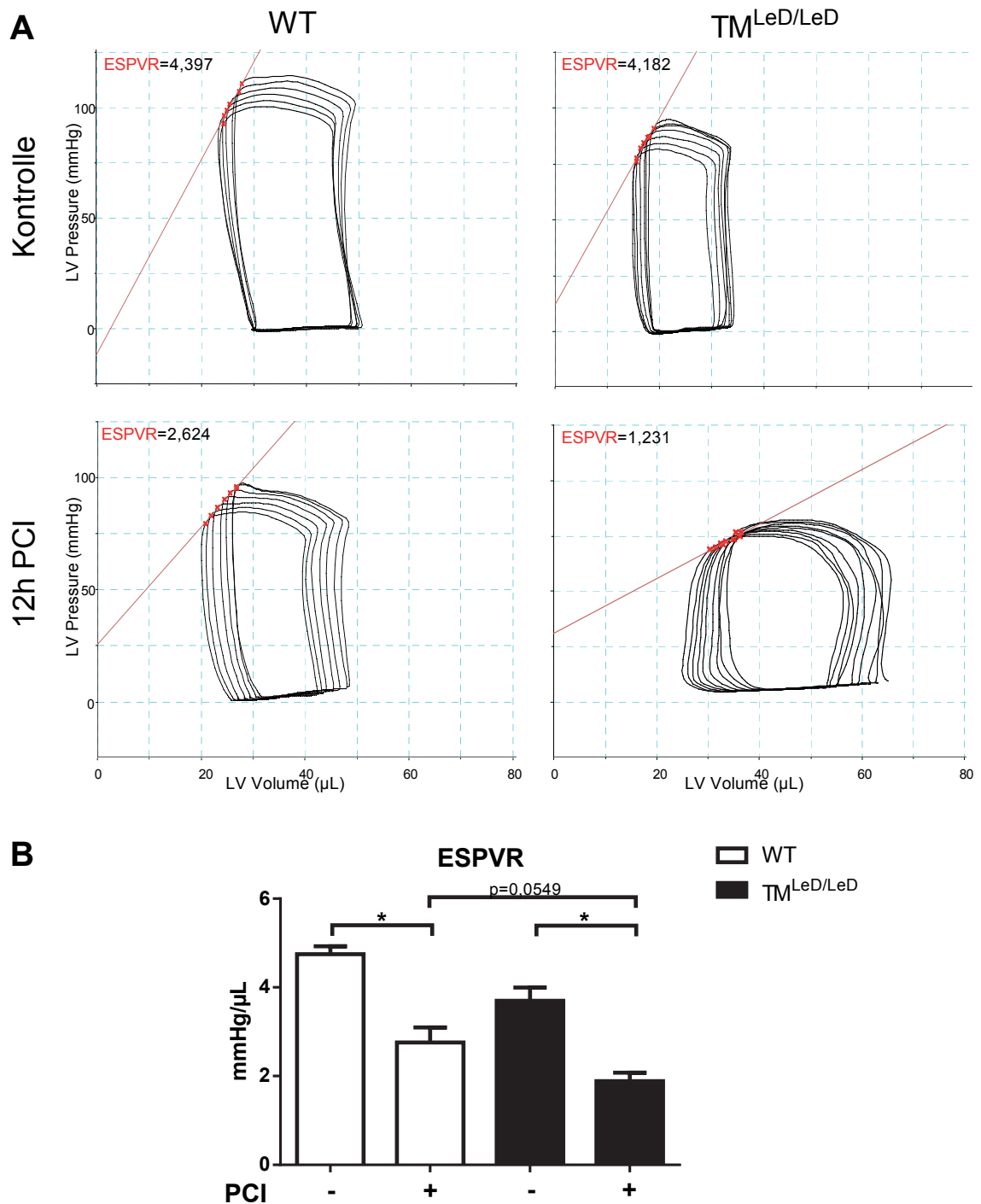


Abbildung 4: Myokardiale Kontraktilität nach 12 h PCI

(A) Repräsentative Druck-Volumen-Kurven während der Vena Cava inferior Okklusion für je ein Tier pro Gruppe. Die Verbindungslinie der endsystolischen Kurvenpunkte (ESPVR = rote Linie) gilt als anerkannter Parameter für die linksventrikuläre Kontraktilität, da er unempfindlich gegenüber Vor- und Nachlast ist. (B) Myokardiale Kontraktilität (ESPVR) in scheinbehandelten Tieren (n=4 pro Gruppe) und 12 h nach PCI (n=7 pro Gruppe). Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

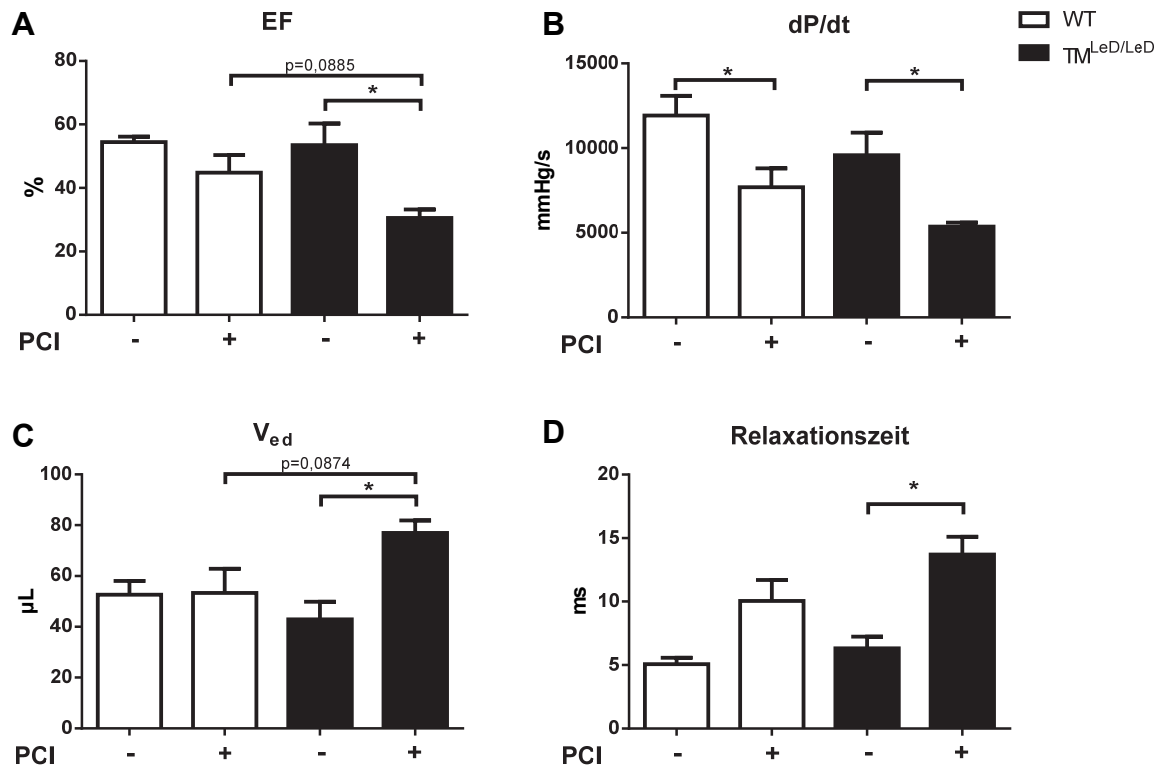


Abbildung 5: Systolische und diastolische Funktionsparameter in scheinbehandelten Tieren und 12 h nach Sepsisinduktion.

(A) Ejektionsfraktion (EF) als klassischer Parameter der systolischen Funktion. (B) Isovolumetrischen Druckänderungen der frühen systolischen Herzfunktion (dP/dt max). (C) Enddiastolisches Volumen (V_{ed}). (D) Isovolumetrische Relaxationszeit als Maß der diastolischen Funktion.

Mittelwert + SEM. n = 4 (scheinbehandelte Tiere) bzw. 7 (PCI). * p<0,05 (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.3 Histopathologie des Herzens nach PCI

4.3.1 Morphologie und Apoptose

Die Morphologie des Herzens zeigte nach Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung an den Paraffinschnitten des Myokardgewebes in allen Gruppen einen unauffälligen Befund mit regelmäßigen und dicht angeordneten Herzmuskelfasern ohne strukturelle Abnormitäten über den gesamten histologischen Schnitt.

Die Bewertung der relativen kardiomyozytären Apoptose ergab zwar einen statistisch signifikanten Unterschied von Apoptose-positiven Ereignissen in den Myokardschnitten 6 h nach PCI in beiden Genotypen im Vergleich zur Kontrolle, jedoch sind diese positiven Ereignisse im Vergleich zur Gesamtzellzahl so gering, dass ihnen keine biologische Relevanz zuzuordnen ist (Abbildung 6A&C). Zudem ist dieser minimale prozentuale Anstieg apoptotischer Ereignisse bereits 12 h nach PCI nicht mehr messbar. Bemer-

kenswert war die Beobachtung, dass die apoptotischen Zellkerne vornehmlich im endothelialen Bereich des Myokards, also im Bereich kleinerer Koronargefäße, lokalisiert waren (Abbildung 6A).

4.3.2 Infiltration des Herzens durch Immunzellen

Im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis kam es zu einer geringfügigen Infiltration des Herzens durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten im Vergleich zur Kontrolle in beiden Genotypen (Abbildung 7A&C). Diese leukozytäre Infiltrationsrate im Myokard trat in einem vergleichbaren Maße sowohl in Wildtypen als auch $TM^{LeD/LeD}$ auf. Wenngleich eine additive Erhöhung 12 h nach PCI nur in den $TM^{LeD/LeD}$ Tieren zu beobachten war, so blieb die generelle Infiltration durch neutrophile Granulozyten zu den untersuchten Zeitpunkten innerhalb der Genotypen vergleichbar. Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Auswertung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Leber und Niere ebenfalls keinen Unterschied zwischen Wildtypen und $TM^{LeD/LeD}$ ergab, wenngleich die Infiltration der Leber einen drastischen Anstieg von Immunzellen nach PCI aufwies (siehe Abbildung 7B, Daten nicht gezeigt).

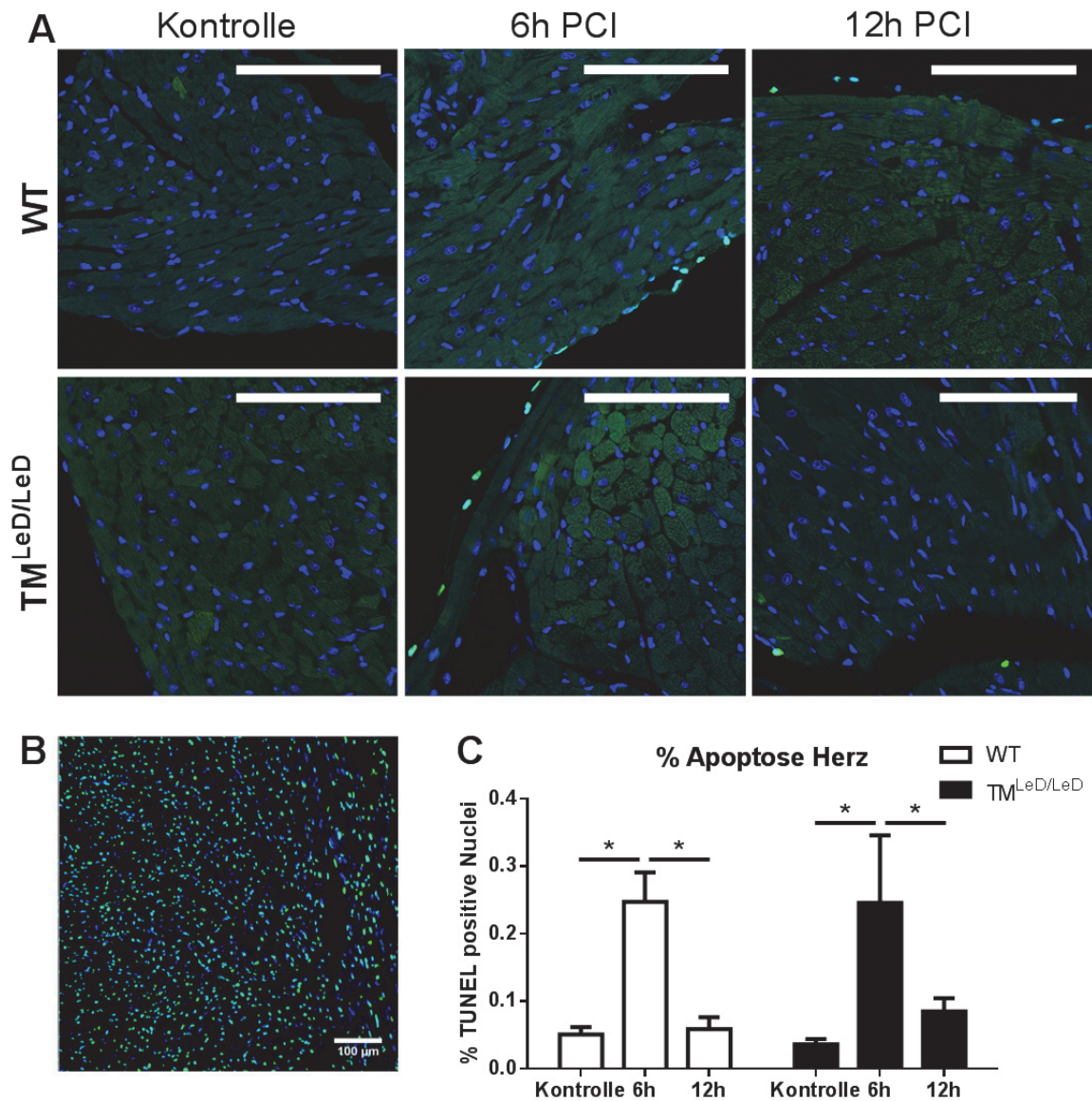


Abbildung 6: Apoptose im Myokard nach PCI

(A) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach immunhistochemischer Färbung apoptotischer Zellkerne (grün) und Gegenfärbung der übrigen Zellkerne mit DAPI (blau) im Herzgewebe. Maßstabsbalken 100 μ m. (B) Fluoreszenzsignal nach DNase-Vorbehandlung an einem Myokardschnitt (=Positivkontrolle Färbung). Maßstabsbalken 100 μ m. (C) Relativen kardiomyozytäre Apoptose (%) bezogen auf den gesamten Herzschnitt. Die Quantifizierung aller apoptotischen Ereignisse erfolgte mit Hilfe des Particel-Analyzer Tools der frei verfügbaren Software ImageJ 1.49 über den gesamten Myokardschnitt (n = 10-12). Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Tukey)

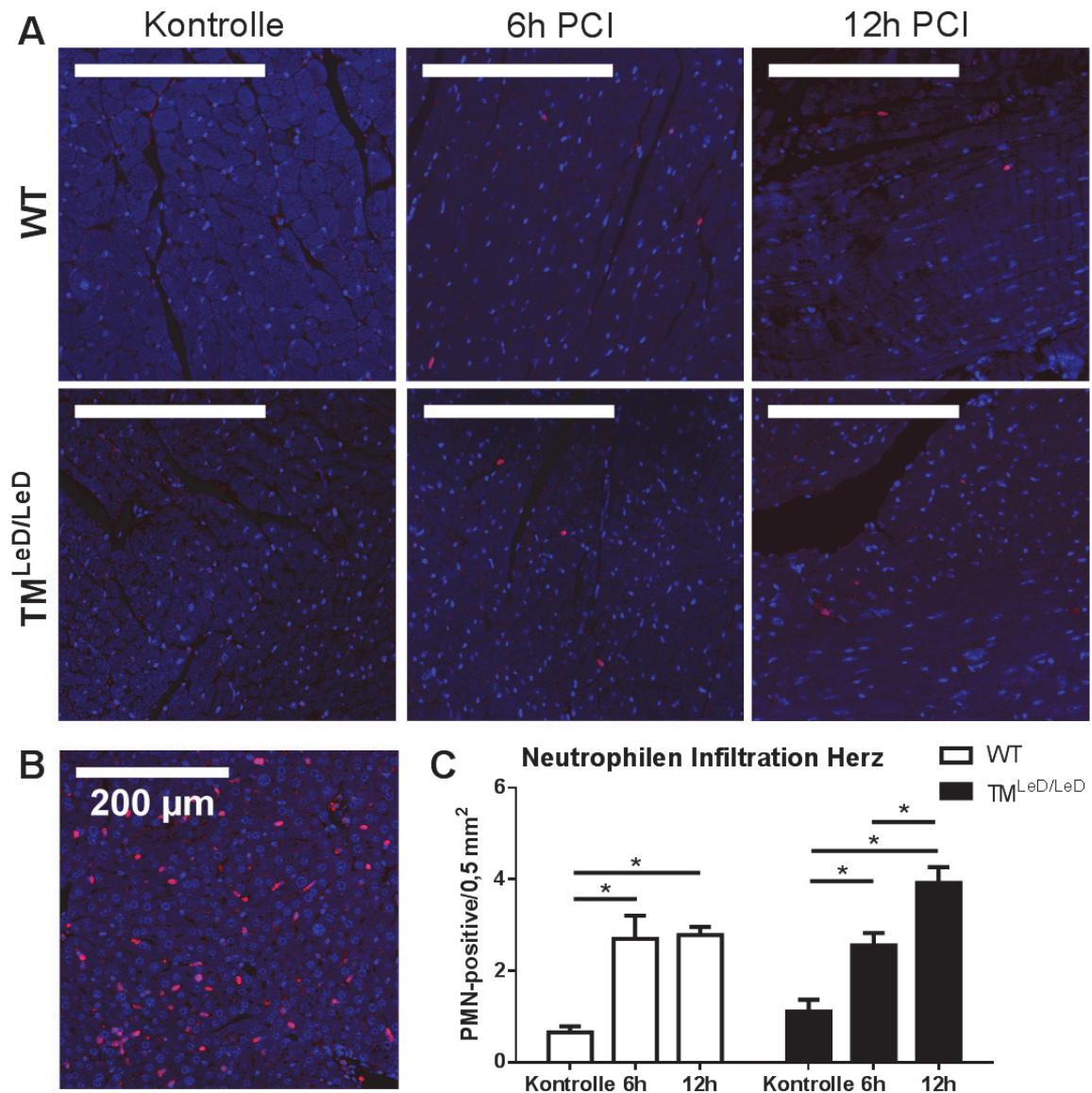


Abbildung 7: Infiltration des Myokards durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten nach PCI

(A) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach immunhistochemischer Färbung von infiltrierenden neutrophilen Granulozyten (rot) und Gegenfärbung der übrigen Zellkerne mit DAPI (blau) im Herzgewebe. Maßstabsbalken 200 μ m. (B) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in der Leber eines PCI-behandelten WT-Tieres. Maßstabsbalken 200 μ m. (C) Infiltration des Herzens durch neutrophile Granulozyten nach polymikrobieller Sepsis. Die Quantifizierung der Neutrophilenzahl erfolgte an jeweils 3 randomisiert ausgewählten Bildausschnitten (Fläche von je 0,5 mm²) pro Schnitt mit Hilfe des Particel-Analyzer Tools der frei verfügbaren Software ImageJ 1.49 (n = 10-12).

Mittelwert + SEM. * p<0,05 (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Tukey)

4.4 Zirkulierende inflammatorische Proteine nach polymikrobieller Sepsis

Pro-inflammatorische Zytokine wirken kardiodepressiv und beeinflussen daher die Pathogenese einer septischen Kardiomyopathie maßgeblich. Die quantitative Bestimmung der sich im Kreislauf befindlichen inflammatorischer Zytokine zeigten, analog zum Myokard (siehe Abschnitt 4.5), eine dramatische Erhöhung von IL-6 und MCP-1 nach PCI in beiden Genotypen. Allerdings war die Konzentration verglichen mit der myokardialen Regulation viel höher. Es war eine deutlich stärkere Regulation von IL-6 nach 6 h PCI in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren verglichen mit den Wildtypen zu beobachten (Abbildung 8). Weiterhin zeigten sich TNF- α und IL-10 nach polymikrobieller Sepsis reguliert, wobei diese Anstiege vergleichsweise gering gegenüber der Regulation von IL-6 und MCP-1 ausfielen (Abbildung 8). Sowohl IFN- γ als auch IL-12p70 zeigten, wie auch im Myokardgewebe, größtenteils Messwerte unterhalb des Referenzbereichs des Assays und daher keine nennenswerten Freisetzen zu den untersuchten Zeitpunkten nach polymikrobieller Sepsis (Daten nicht gezeigt).

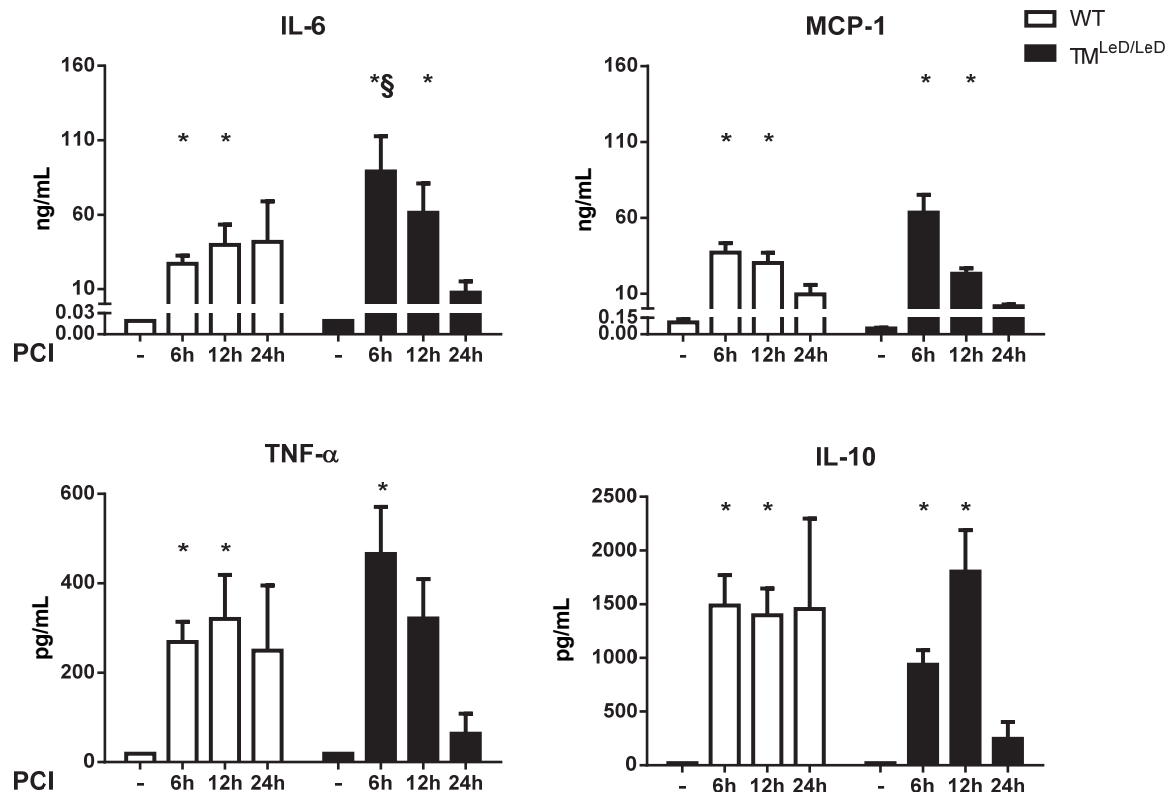


Abbildung 8: Zirkulierende inflammatorische Proteine nach polymikrobieller Sepsis

Mittelwert + SEM. n = 6 pro Kontrollgruppe bzw. 5-24 pro Interventionsgruppe. *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. WT (Kruskal-Wallis, Post-hoc Analyse nach Dunn).

Darüber hinaus waren die Plasmaproteinlevel für kardiales Troponin und HMGB1 6 h nach PCI in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren signifikant gegenüber der WT erhöht (Abbildung 9). Auch bei diesen beiden Parametern erwiesen sich die Kontrollgruppen der jeweiligen Genotypen unauffällig und vergleichbar gering. Anhand dieser Organschädigungsparameter wurde ebenfalls eine veränderte Dynamik der Wirtsantwort in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren deutlich, zeigen sich doch die Werte in Abwesenheit der LED-TM deutlich früher signifikant und insgesamt stärker erhöht.

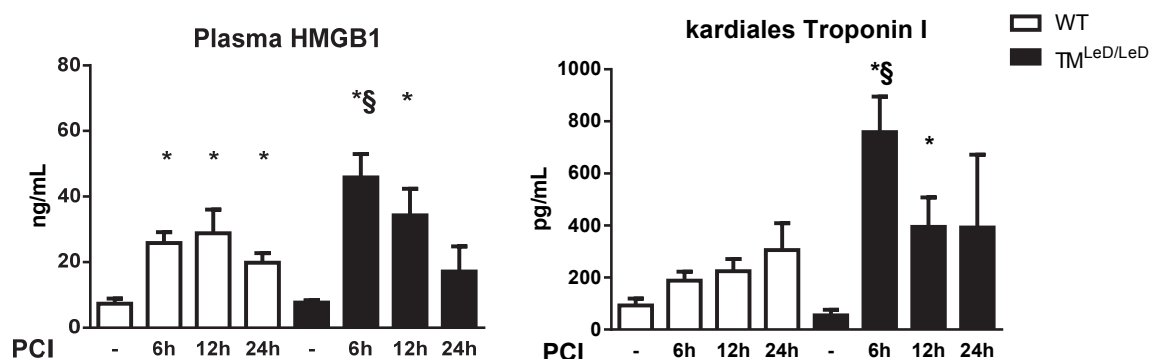


Abbildung 9: Zeitabhängige Veränderungen von zirkulierendem HMGB1 und kardialem Troponin I

Mittelwert + SEM. n = 5-8 pro Kontrollgruppe bzw. 5-18 pro Interventionsgruppe. *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. WT (Kruskal-Wallis, Post-hoc Analyse nach Dunn).

Die Korrelationsanalyse für die in Abbildung 9 gezeigten Parameter zeigte einen positiven Zusammenhang von HMGB1 und Troponin nach PCI ($r = 0,7653$, $p < 0,05$, Abbildung 10). Hierin wurde deutlich, dass bei einer Erhöhung von HMGB1 im Plasma, kardiales Troponin ebenfalls erhöht vorlag. Weiterhin gilt zu beachten, dass sich dieser Zusammenhang in Abwesenheit der LED-TM stärker darstellte.

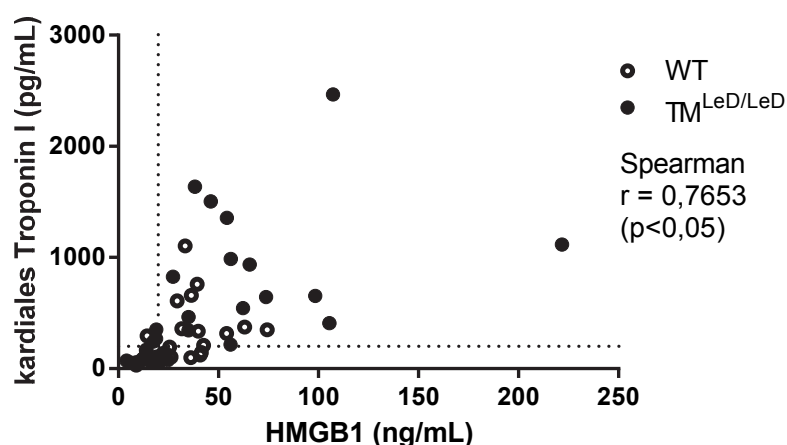


Abbildung 10: Positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von HMGB1 und kardialem Troponin im Plasma nach polymikrobieller Sepsis

Korrelationsanalyse nach Spearman mit sämtlichen Werten nach PCI (exklusive der unbehandelten Kontrollen) ungeachtet des Zeitpunktes miteinander in Beziehung gesetzt. n = 31 (WT) bzw. 25 ($TM^{LeD/LeD}$). Die gestrichelten Linien im Diagramm markieren jene maximalen Konzentrationen, die auch in Kontrolltieren gemessen wurden.

4.5 Kardiale Inflamationsreaktion nach polymikrobieller Sepsis

4.5.1 Myokardiale mRNA Expressionsänderungen inflammatorischer Mediatoren

Die mRNA-Expressionsanalyse des Myokards nach polymikrobieller Sepsis zeigte einen dramatischen Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen, wobei eine signifikante Erhöhungen der Zytokine IL-1 β , IL-6 und MCP-1 in den TM^{LeD/LeD}-Tieren nach 6 h PCI verglichen mit den Wildtypen festzustellen war (Abbildung 11). Dieser Genotyp-spezifische Unterschied zeigte sich zeitabhängig und ist innerhalb von 24 h nach PCI nur noch als Tendenz zu verzeichnen. Die Analyse der Expressionsänderungen von dem anti-inflammatorisch wirkenden Zytokin IL-10 ergab nach PCI ebenfalls eine Erhöhung, jedoch zeigten sich hier keine Unterschiede in Abhängigkeit von der LED-TM im Rahmen der untersuchten Zeitpunkte (Abbildung 12).

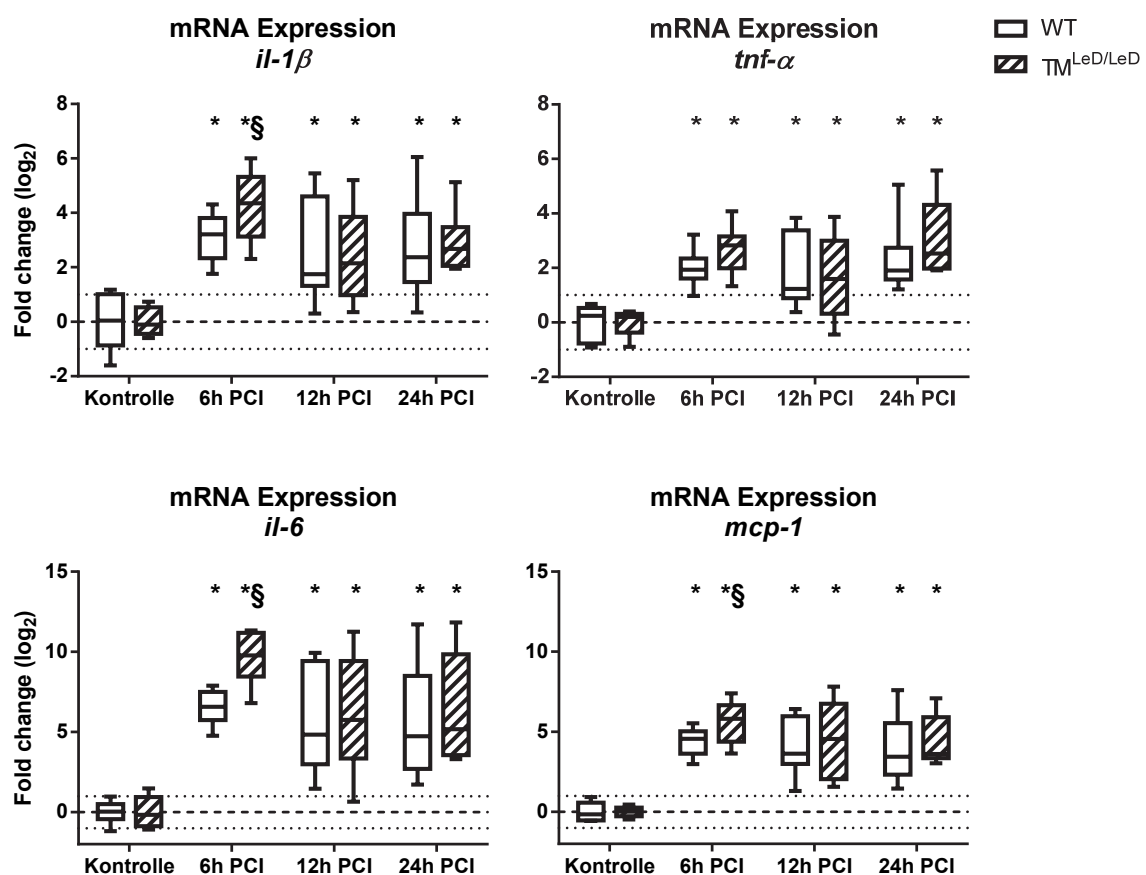


Abbildung 11: Zeitabhängige mRNA-Expressionsänderungen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Relative mRNA-Expressionsänderung von kardiodepressiv wirkenden Zytokinen im Myokard nach PCI bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe.

Box-Plots zeigen den Median und Whiskers von Minimum zum Maximum (n = 6-12 pro Gruppe). *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. WT (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

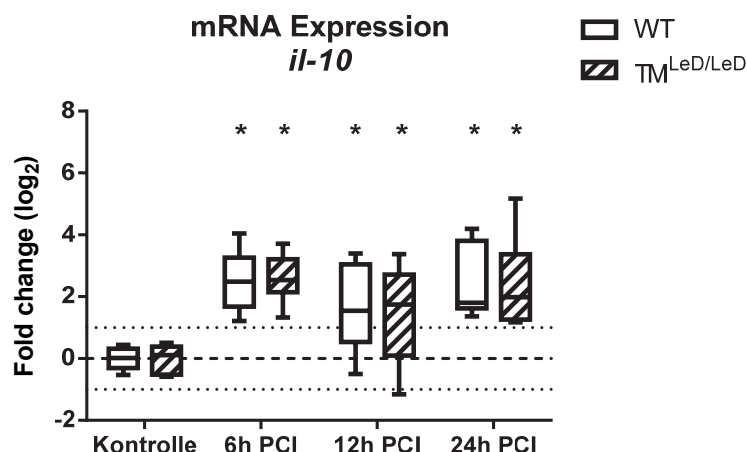


Abbildung 12: mRNA-Expression von IL-10 im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Relative mRNA-Expressionsänderung eines anti-inflammatorischen Zytokins im Myokard nach PCI bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe.

Box-Plots zeigen den Median und Whiskers von Minimum zum Maximum (n = 6-12 pro Gruppe). * p<0,05 vs. Kontrolle (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.5.2 Inflammatorische Proteinlast im Myokard

Ergänzend zur relativen Quantifizierung von inflammations-assoziierten Zytokinen im Myokard auf transkriptioneller Ebene zeigte die quantitative Bestimmung der Zytokine im Myokard auf Proteinebene ebenfalls eine deutliche Erhöhung von IL-6 und MCP-1 nach 6 h PCI in den TM^{LeD/LeD}-Tieren, verglichen mit den Wildtypen, der zu späteren Zeitpunkten nur noch in einer tendenziellen Erhöhung sichtbar ist (Abbildung 13). Alle anderen Parameter (IL-10, TNF- α , IFN- γ und IL-12p70) befanden sich unterhalb des Messbereichs des Assays und zeigten somit keine nennenswerten Regulationen nach polymikrobieller Sepsis zu den untersuchten Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt).

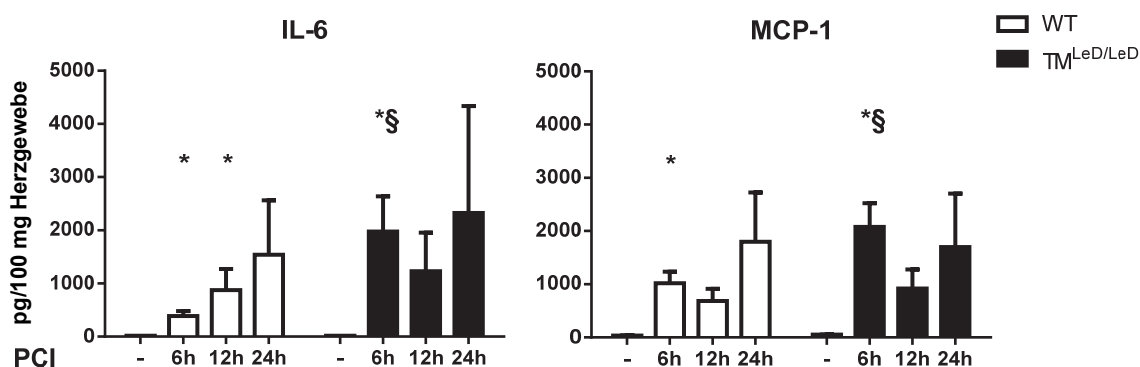


Abbildung 13: Zytokinfreisetzung im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Quantifizierung der myokardialen Zytokinfreisetzung auf Proteinebene anhand von Herzlysaten nach PCI.

Mittelwert + SEM. n = 5 pro Kontrollgruppe bzw. 6-12 pro Interventionsgruppe. *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. WT (Kruskal-Wallis, Post-hoc Analyse nach Dunn).

4.5.3 Expressionsänderungen von Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren der inflammatorischen Reaktion

Die mRNA-Expressionsanalyse der Rezeptoren im Myokard zeigte einen deutlichen Anstieg von TLR2 und TLR4 mRNA im Rahmen des septischen Insults. Die Expressionsänderung von TLR4 ist mit einem mittleren Anstieg nach PCI um das 2- bis 4-fache verglichen mit der annähernd 2- bis 8-fachen Regulation von TLR2 relativ gering, jedoch zeigte sich auch hier 6 h nach PCI ein signifikanter Anstieg für die $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere (Abbildung 14). Die ergänzende Analyse dieser Regulation nach polymikrobieller Sepsis mittels Western Blot bestätigte diese Expressionszunahme.

Ergänzend dazu ergab die Analyse der den TLR nachgeschaltet aktivierten Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene ebenfalls einen signifikanten Anstieg nach PCI, der in Abhängigkeit von der LED-TM zeitlich negativ moduliert ist (Abbildung 15).

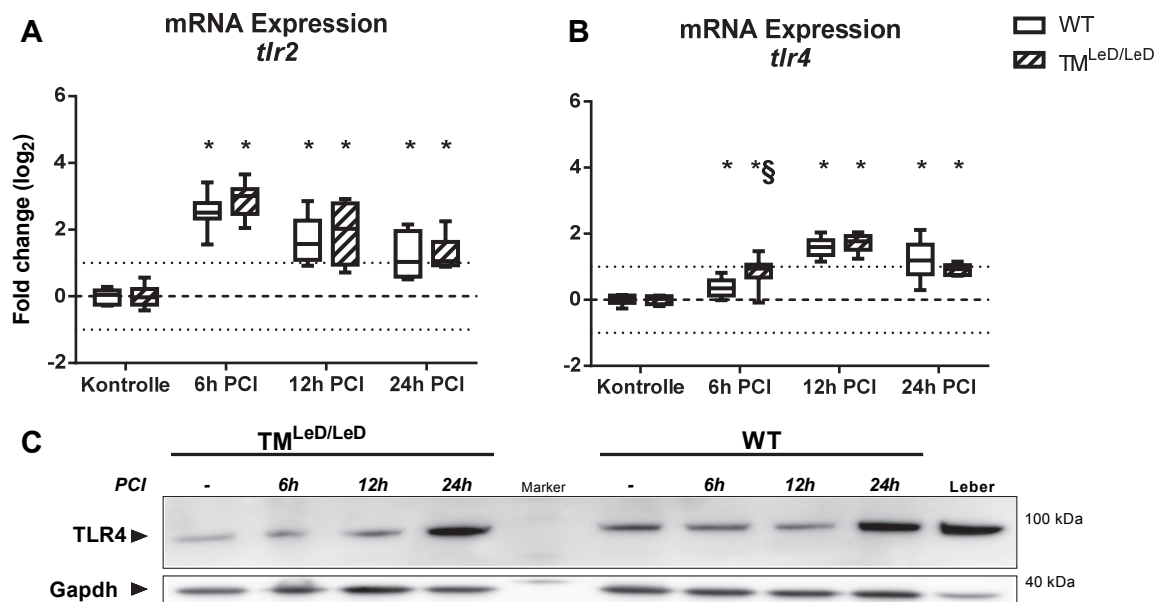


Abbildung 14: Gesteigerte Expression von TLR2 und TLR4 im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Relative mRNA-Expressionsanalyse für TLR2 (A) und TLR4 (B) im Myokard bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe. Box-Plots zeigen den Median und Whiskers von Minimum zum Maximum ($n = 6-12$ pro Gruppe). * $p < 0,05$, * vs. Kontrolle, § vs. WT (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak). (C) Repräsentative Western Blot Abbildung für TLR4 Regulation nach PCI im Myokard (gezeigt ist ein exemplarisches Signal aus 3 unabhängigen Experimenten für TLR4 mit dem zugehörigen Housekeeper Gapdh).

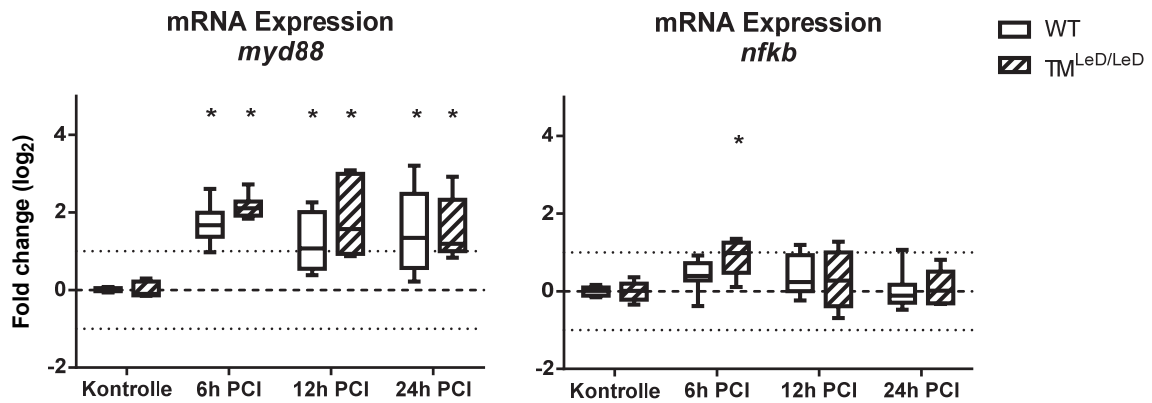


Abbildung 15: mRNA-Expression von TLR-aktivierten Transkriptionsfaktoren im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Relative mRNA-Expressionsanalyse für die den TLR nachgeschaltet aktivierten Transkriptionsfaktoren im Myokard bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe.

Box-Plots zeigen den Median und Whiskers von Minimum zum Maximum ($n = 6-12$ pro Gruppe). *§ $p < 0,05$, * vs. Kontrolle, § vs. WT (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.6 Kardiomyozytäre Inflamationsreaktion

4.6.1 kardiomyozytäre mRNA Expressionsänderungen von inflammatorischen Mediatoren nach *in vitro* Stimulation mit Zytokinmix

Da sich *in vivo* ein deutlich erhöhter pro-inflammatorisch wirkender Zytokinsturm im Myokard der TM^{LeD/LeD} im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie herausgestellt hat, erfolgte nun die Analyse der pro-inflammatorischen Expression von isolierten Kardiomyozyten. Die *in vitro* Studie sollte klären, ob die zeitlich modulierte Inflamationsreaktion in Abhängigkeit der LED-TM primär von den Kardiomyozyten selbst ausgeht.

Auch *in vitro* war nach Stimulation mit einem Zytokinmix nach 6 h eine tendenziell erhöhte mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und MCP-1 in den Kardiomyozyten denen die LED-TM fehlt messbar, welche im Falle von IL-1 β signifikant war (Abbildung 16). Im Gegensatz zu den *in vivo* Expressionsänderungen nach 6 h PCI zeigten sich IL-1 β und TNF- α deutlich stärker heraufreguliert (Vergleich Abbildung 11). Für IL-6 und MCP-1 zeigten sich zwar vergleichbare Regulationsintensitäten zu den *in vivo* myokardialen Expressionsänderungen, jedoch war hier nur eine tendenzielle Expressionserhöhung dieser Kandidatengene in Abwesenheit der LED-TM zu verzeichnen. Weiterhin war keine Regulation von IL-10 nach *in vitro* Stimulation mit Zytokinmix zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

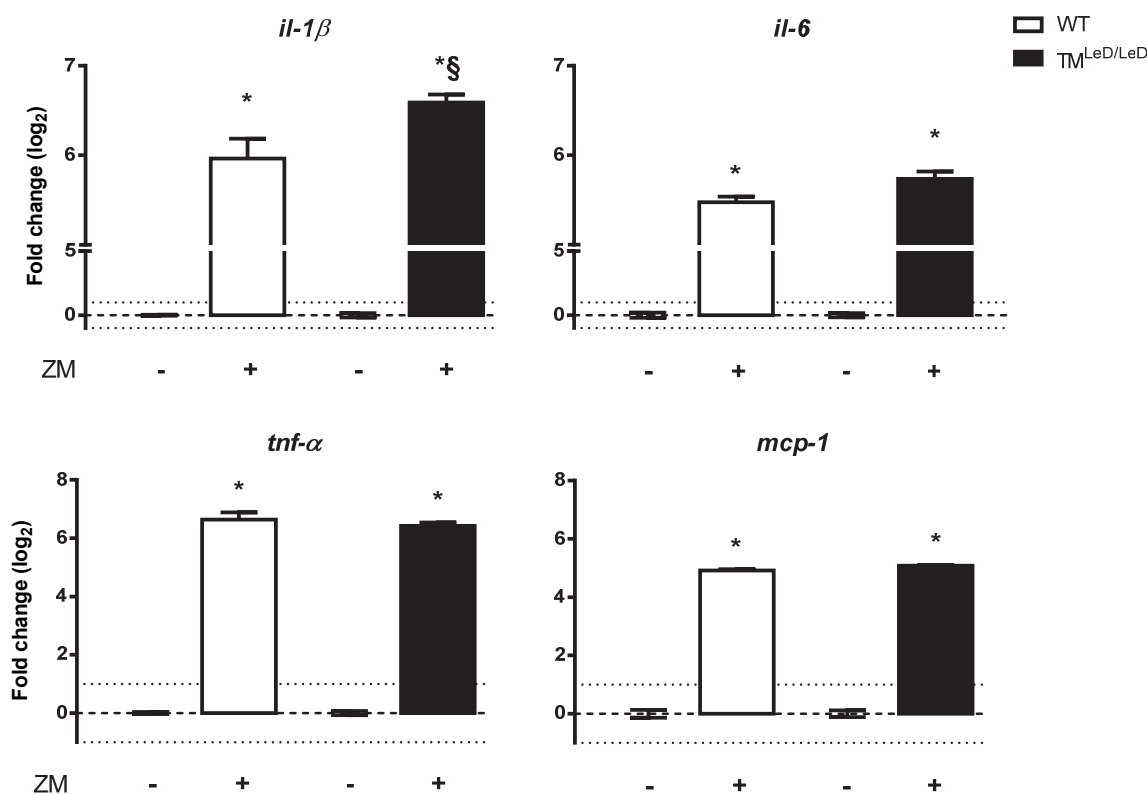


Abbildung 16: mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen in Kardiomyozyten nach 6-stündiger Stimulation mit Zytokinmix

Relative mRNA-Expressionsanalyse nach Stimulation von neonatalen Kardiomyozyten mit einem Zytokinmix (ZM) für 6 h bezogen auf die jeweilige unstimulierte Kontrollgruppe. Mittelwert + SEM. n = 8-11 (Kontrolle) bzw. 13-20 (stimuliert). *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. WT (1-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.6.2 Kardiomyozytäre Freisetzung inflammatorischer Mediatoren nach Stimulation mit LPS und/oder HMGB-1

Um weiterhin die direkten Effekte von HMGB1 auf die immunomodulatorische Funktion der Kardiomyozyten zu untersuchen, erfolgte die vergleichende Stimulation von primären adulten Kardiomyozyten mit 1 µg/mL HMGB1 (Disulfide-HMGB1, LPS-free, HMGBiotech, gelöst in Medium) und/oder 100 ng/mL LPS (LPS von *Escherichia coli* Serotyp O111:B4, Sigma-Aldrich, gelöst in Medium mit 1% Mausserum). Die anschließende quantitative Bestimmung der durch die Kardiomyozyten in den Überstand frei gesetzten Zytokine, zeigte eine insgesamt milde Regulation der Zytokine nach Stimulation. Lediglich IL-6 und MCP-1 waren quantifizierbar reguliert und hatten vergleichbare Regulationsmuster. Da nur die Freisetzung von MCP-1 zuverlässig innerhalb des Referenzbereichs des Assay lag, werden diese Ergebnisse im Folgenden genauer betrachtet (Abbildung 17). Insgesamt wurde MCP-1 in den TM^{LeD/LeD}-Kardiomyozyten stärker freigesetzt, wobei das Maximum 12 h nach Stimulation auftrat. Die WT-

Kardiomyozyten zeigten bereits 6 h nach Stimulation die maximale MCP-1 Freisetzung innerhalb der hier untersuchten Zeitpunkte, welche bereits nach 12 h wieder rückläufig war. Weiterhin zeigte sich zum einen, dass eine Stimulation mit HMGB1 eine vergleichbare Konzentration von MCP-1 im Überstand induziert, wie jene durch LPS-Stimulation verursacht und zum anderen, dass eine Ko-Stimulation von beiden Substanzen keine additiven Effekte in der Zytokinfreisetzung verursachte (ANOVA mit Holm-Sidak Post-hoc Analyse, $p > 0,05$).

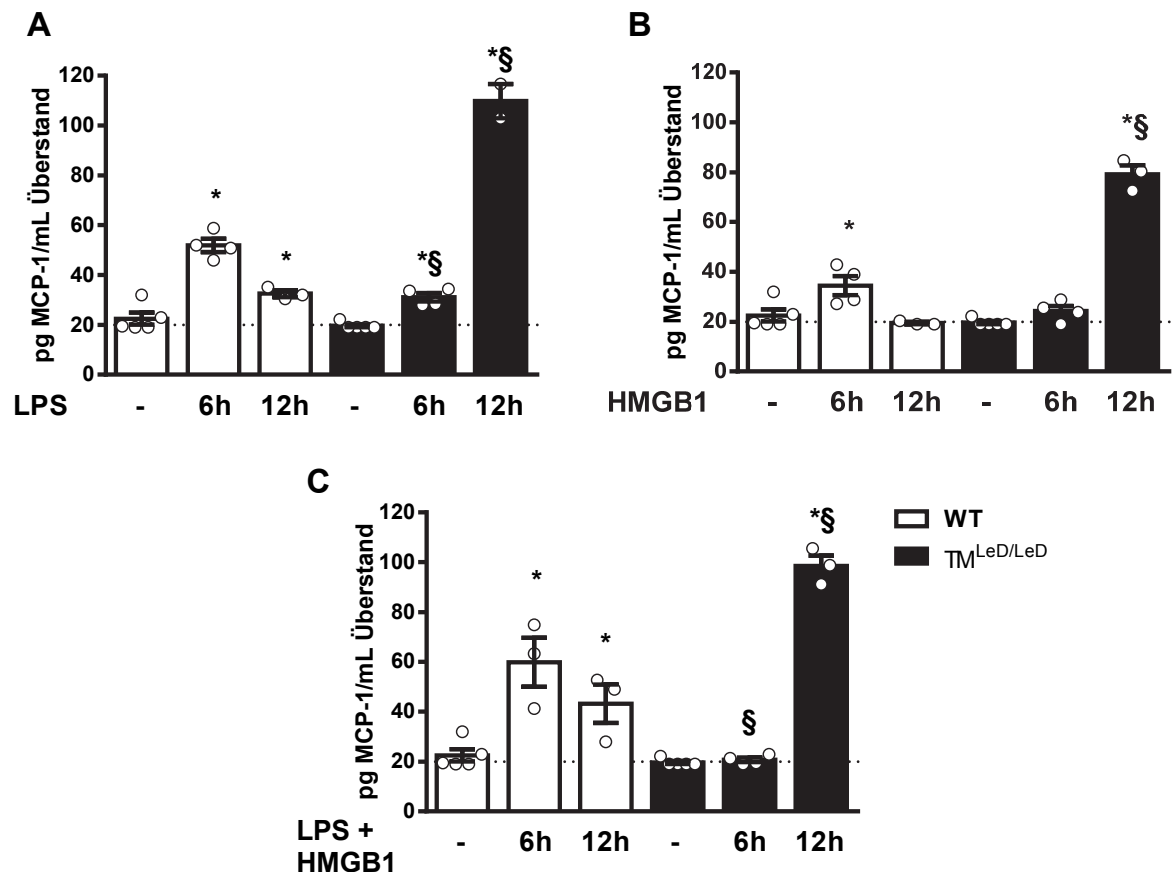


Abbildung 17: MCP-1 Freisetzung durch adulte Kardiomyozyten nach Stimulation mit LPS und/oder HMGB1

(A) Stimulation mit 100 ng/mL Endotoxin (LPS), oder (B) 1 µg/mL HMGB1, oder (C) einer Kombination aus beiden Stimulanzen.

Mittelwert + SEM. Gruppengröße entspricht den eingezeichneten Kreisen in jedem Balken.

Gestrichelte Linie im Diagramm entspricht dem unteren Referenzbereich des Assay. * § $p < 0,05$,

* vs. Kontrolle, § vs. WT (1-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.7 Modifikation der Kalziumhomöostase im Myokard nach Sepsis

4.7.1 Phospholamban Phosphorylierung nach polymikrobieller Sepsis

Die Western Blot-Analysen aus 5 unabhängigen Experimenten zu Phospho-Phospholamban (Phospho-PLN) zeigten eine spezifische Bande für Phospho-PLN bei etwa 24 kDa (Abbildung 18). Ungeachtet vom Genotyp der Versuchstiere zeigte sich, dass PLN in der frühen Phase nach Sepsisinduktion (6 und 12 h) konsistent hypophosphoryliert im Vergleich zu der unbehandelten/scheinbehandelten Kontrolle vorlag. Der durch die Hypophosphorylierung gesenkte Kalziumflux resultiert *in vivo* in einer verlängerten Relaxationszeit und einer reduzierten Kontraktilität. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtungen aus den intrakardialen Druck-Volumenmessungen. Die densitometrische Auswertung der Bandenstärke zeigte zudem eine Erholung des Phosphorylierungsstatus von PLN nach 24 h.

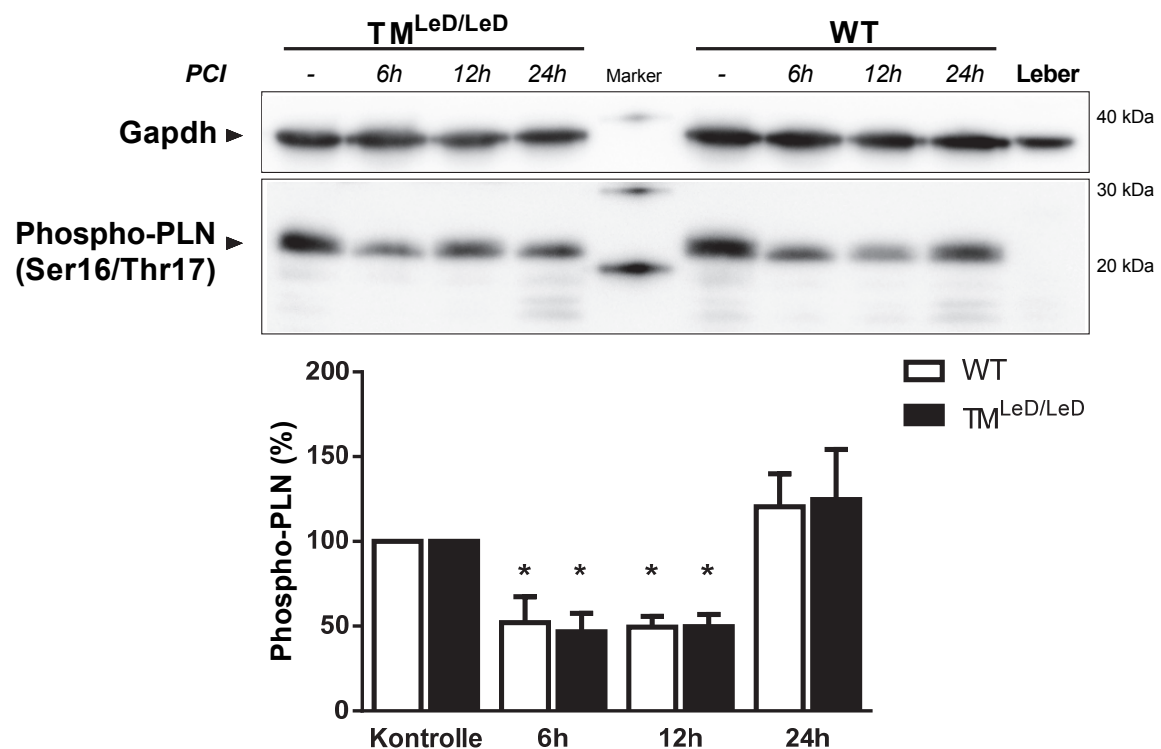


Abbildung 18: Phospho-Phospholamban Konzentrationen im Myokard nach polymikrobieller Sepsis

Der obere Teil der Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus 5 unabhängigen Experimenten für phosphoryliertes Phospholamban (Phospho-PLN) und dem zugehörigen Housekeeper Gapdh. Das detektierte Signal zu Phospho-PLN zeigt eine spezifische Bande für das myokardiale Protein nach Phosphorylierung an Serin 16 (Phosphorylierung durch Proteinkinase A) bzw. Threonin 17 (Phosphorylierung durch Kalzium/Kalmodulinkinase) bei etwa 24 kDa.

Der untere Teil der Abbildung zeigt den Phosphorylierungszustand von Phospholamban relativ bezogen auf die jeweilige Kontrolle aus 5 unabhängigen Experimenten. Mittelwert + SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.7.2 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und Matrix-Metalloproteinase 9

Eine Ursache für eine gestörte Kalziumhomöostase im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie wird im vermehrten Auftreten von Sauerstoffradikalen (z. B. Stickstoffmonoxid oder Peroxynitrit) während pathophysiologischer Signalprozesse vermutet. Neben einer mitochondrialen Dysfunktion verursachen Sauerstoffradikale auch Phospholamban Dephosphorylierung und beeinflussen so die β -adrenerge Signaltransduktion während der kardialen Kontraktion negativ. In den mRNA-Expressionsanalysen im Myokard konnte eine vermehrte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in beiden Genotypen nach PCI gezeigt werden, wobei auch hier, vergleichbar zum Phospho-Phospholambansignal aus den Western Blot-Analysen, kein Einfluss der LED-TM festzustellen war (Abbildung 19). Weiterhin sind die so vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale in der Lage Matrix-Metalloproteasen (MMP) zu aktivieren und durch diese die Proteine der Myofilamente abzubauen. Die mRNA-Expressionsanalyse des Myokards zeigte hierbei im Vergleich zur Expressionsänderung der iNOS einen zeitlich versetzten signifikanten Anstieg der Expression von MMP-9 nach 24 h PCI, wobei die Expressionsänderungen gegenüber derer von iNOS vergleichsweise moderat ausfielen (Abbildung 19).

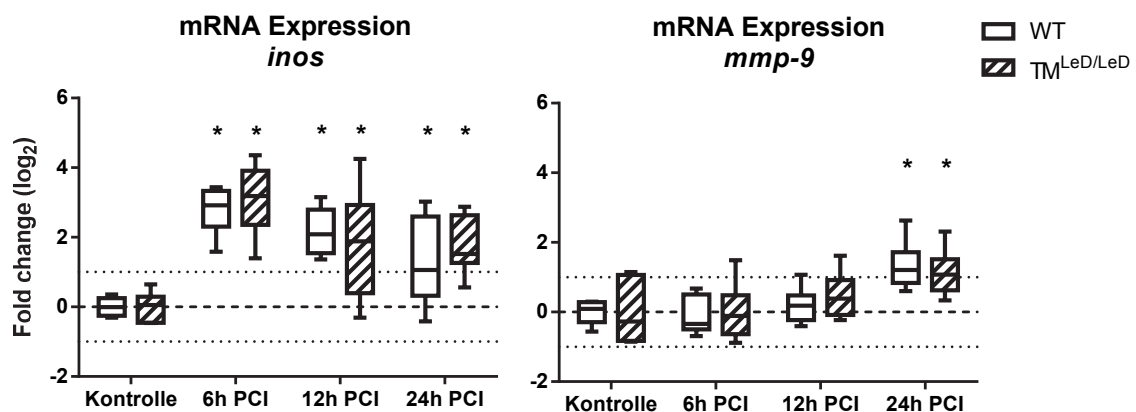


Abbildung 19: mRNA-Expressionsänderungen von iNOS und MMP9 im Myokard 6, 12 und 24 h nach PCI

Relative mRNA-Expressionsänderung von iNOS (links) und MMP-9 (rechts) im Myokard bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe.

Box-Plots zeigen den Median und Whiskers von Minimum zum Maximum (n = 6-12 pro Gruppe). * p<0,05 vs. Kontrolle (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.8 *In vitro* Untersuchung der Rezeptoren TLR2 und TLR4 im Rahmen der kardialen Dysfunktion

Sowohl die Ergebnisse aus den *in vitro* Stimulationsexperimenten (siehe Abschnitt 4.6) als auch aus den *in vivo* Sepsisexperimenten (siehe Abschnitt 4.4 und 4.5) gaben deutliche Hinweise darauf, dass die LED-TM im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis die damit einhergehende kardiale Dysfunktion über anti-inflammatorische Eigenschaften moduliert, vermittelt durch die Bindung von HMGB1 und LPS. Die daran beteiligten Rezeptoren sind vermutlich TLR2 und/oder TLR4. Daher wurde angestrebt, den molekularen kardiomyozytären Mechanismus durch eine Überexpression von vollständigem Thrombomodulin bzw. Thrombomodulin ohne LED-TM bei gleichzeitiger Inaktivierung dieser Rezeptoren zu untersuchen.

4.8.1 Auswertung der *in vitro* Plasmid-DNA/siRNA Transfektion

Die vergleichende Analyse der drei ausgetesteten liposomalen Transfektionsstrategien (siehe Tabelle 5, Abschnitt 3.8) ergab auf mRNA-Ebene für alle drei verwendeten Protokolle eine stabile Überexpression von TM, unabhängig von der verwendeten Plasmid-DNA (Abbildung 20 B). Die mRNA-Analyse zur Überexpression zeigte weiterhin, dass eine Behandlung mit SAINT-MIX im Vergleich zu X-treme Gene 9 DNA, eine geringere Transfektionseffizienz aufwies. Die ergänzende semiquantitative Analyse der Proteinexpression ergab wiederum keine signifikanten Unterschiede in der Überexpression zwischen diesen beiden Reagenzien in neonatalen Kardiomyozyten (relative Expressionszunahme im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle: SAINT-MIX: $63,4 \pm 9,2$ %, X-treme Gene 9 DNA: $71,5 \pm 16,9$ %), wobei die HL-1 Zelllinie deutlich stärkere Expressionszunahmen nach Transfektion zeigte (Abbildung 20 A). Die Analyse des siRNA vermittelten *Knockdowns* von TLR2 und TLR4 erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR und der anschließenden relativen Quantifizierung der Expressionsänderungen im Vergleich zu *Non-targeting* siRNA-behandelten Kontrollzellen (Abbildung 21). Auch hier zeigte sich, dass alle Strategien die Expression der entsprechenden Rezeptoren signifikant vermindern, jedoch war lediglich SAINT-MIX in der Lage, die Expression beider Zielrezeptoren um etwa 70 bis 80% zu reduzieren (TLR2 *Ratio* $0,31 \pm 0,05$; TLR4 *Ratio* $0,21 \pm 0,02$). Die Bestimmung der LDH-Konzentrationen im Zellkulturüberstand, im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen, zeigte für alle verwendeten Transfektionsreagenzien nur geringfügige Erhöhungen (Daten nicht gezeigt), so dass SAINT-MIX als

passendes Reagenz für eine kombinierte Transfektion von pcDNA und siRNA identifiziert werden konnte.

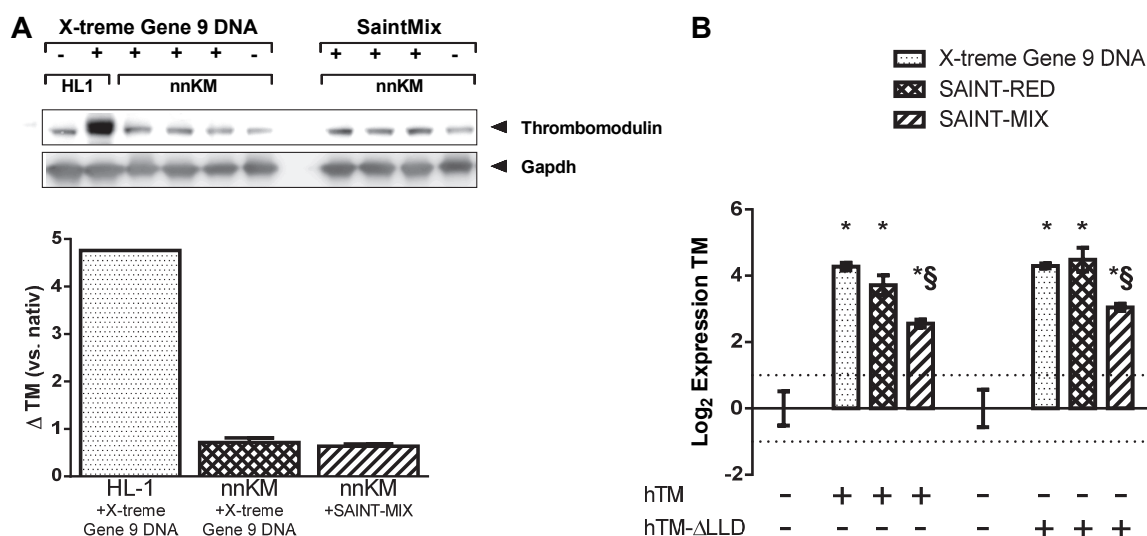


Abbildung 20: Proteinquantifizierung und mRNA-Expression nach Überexpression von Thrombomodulin in neonatalen Kardiomyozyten

(A) Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Thrombomodulin (TM) in neonatalen Kardiomyozyten (nnKM) nach Transfektion. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte + SEM der Regulationszunahme von TM (Δ TM) gegenüber einer untransfizierten Kontrolle aus 3 unabhängigen Experimenten in nnKM dar. HL-1 (Kardiomyoblasten Zelllinie).

(B) Relative mRNA-Expressionsänderung von Thrombomodulin (TM) nach Transfektion mit vollständigem humanen TM (hTM) oder mit humanem Thrombomodulin ohne LED-TM (hTM- Δ LLD) in nnKM im Vergleich zu untransfizierten Kontrollen. n = 3-24. *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. X-treme Gene 9 (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

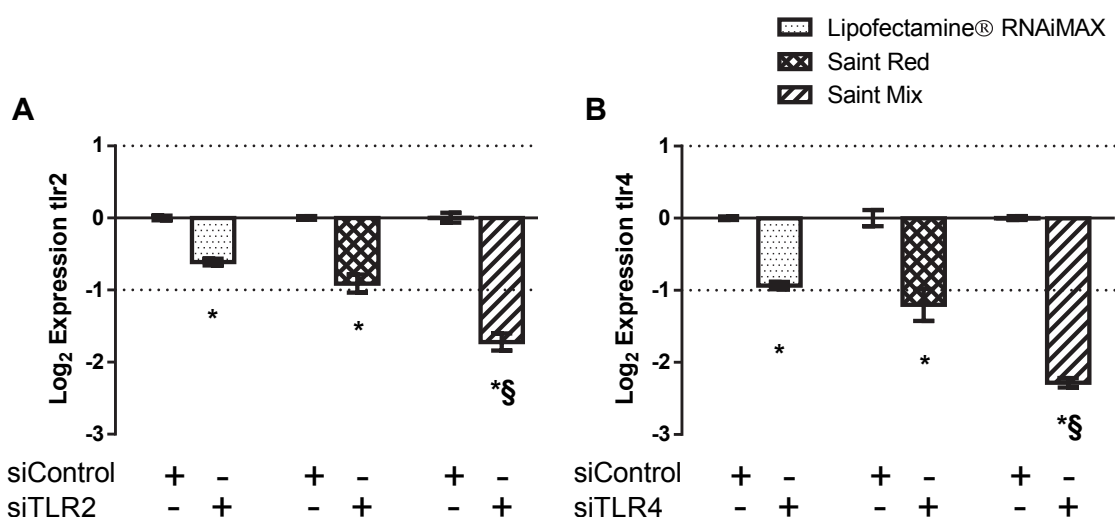


Abbildung 21: mRNA-Expression nach siRNA vermittelter Degradierung von TLR2 und TLR4 in neonatalen Kardiomyozyten

Relative mRNA-Expressionsänderung nach siRNA vermittelten *Knockdowns* von TLR2 (A) und TLR4 (B) im Vergleich zu *Non-targeting* siRNA-behandelten Kontrollzellen (siControl). n = 4-10. *§ p<0,05, * vs. Kontrolle, § vs. Lipofectamine® RNAiMAX (2-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Holm-Sidak).

4.8.2 Inflammationsreaktion nach *in vitro* Transfektion

Die Analyse der mRNA-Expression des Zytokins IL-6 nach Stimulation für einen Zeitraum von 6 h zeigte für Kardiomyozyten, die mit vollständigem humanen Thrombomodulin (hTM, Abbildung 22 A) transfiziert wurden, eine Reduktion der Genexpression. Diese Expressionsminderung zeigte sich signifikant vermindert bei einer siRNA-vermittelten Degradierung von TLR2, jedoch nicht bei einer Behandlung mit siRNA gegen TLR4. Die Behandlung mit humanen Thrombomodulin ohne LED-TM (hTM- Δ LLD, Abbildung 22 A) zeigte unabhängig von einer simultanen Behandlung mit siRNA gegen die Rezeptoren keine Expressionsminderung von IL-6 nach Stimulation. Die Analyse von weiteren inflammationsassoziierten Zytokinen offenbart hingegen deutliche expressionsmindernde Effekte in den transfizierten Zellen nach Stimulation mit Zytokinmix, unabhängig vom Vorhandensein der LED-TM (Abbildung 22 B&C), wenngleich auch hier teilweise eine Tendenz für eine deutlichere Expressionsminderung in Anwesenheit der LED-TM zu verzeichnen ist (Abbildung 22 B).

Obwohl sich eine stärkere Milderung der Expressionsänderungen in Abhängigkeit von der LED-TM in Tendenzen insgesamt am deutlichsten bei einer simultanen siRNA-Transfektion gegen TLR2 zeigte (Abbildung 22 A&B), lassen die vorliegenden Daten keine eindeutigen Rückschlüsse auf dessen Beteiligung während der Signaltransduktion zu.

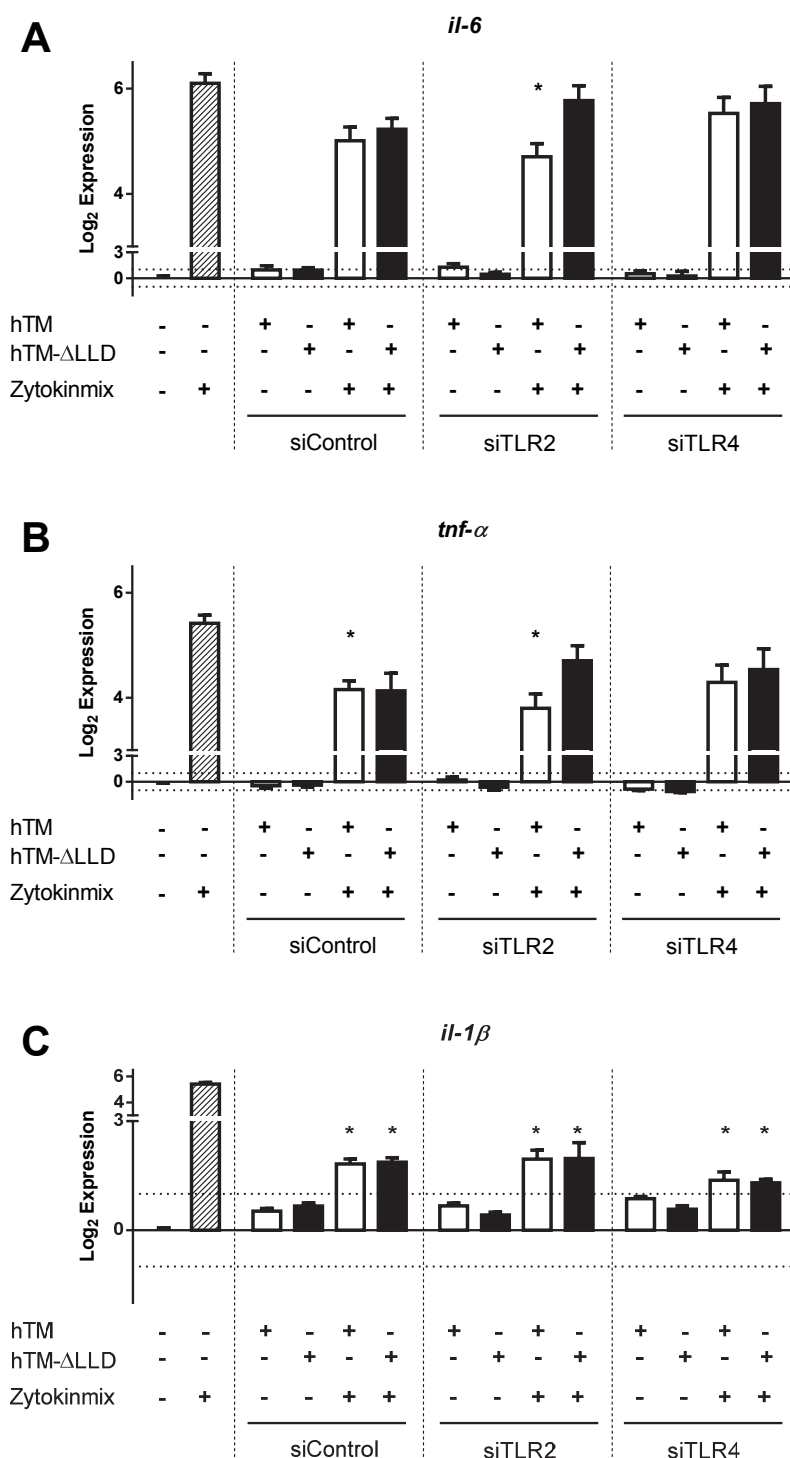


Abbildung 22: mRNA-Expression von Zytokinen nach Transfektion mit hTM oder hTM-ΔLLD bei gleichzeitiger siRNA-vermittelter Degradierung der Rezeptoren TLR2 oder TLR4

Relative mRNA-Expressionsänderung des Zytokins IL-6 (A), TNF-α (B) oder IL-1β (C) nach Transfektion und nachfolgender Stimulation für einen Zeitraum von 6 h im Vergleich zu den jeweiligen untransfizierten/unstimulierten Kontrollen. hTM – vollständiges humanes Thrombomodulin, hTM-ΔLLD – humanes Thrombomodulin ohne LED-TM, siControl – *Non-targeting* siRNA, siTLR2 – siRNA gegen TLR2, siTLR4 – siRNA gegen TLR4. Mittelwert + SEM. n = 3 - 5. * p<0,05 vs. stimulierte Kontrolle (1-way ANOVA, Post-hoc Analyse nach Tukey).

5 Diskussion

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der LED-TM sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einer verstärkten Inflamationsreaktion sowie *in vivo* mit einer schlechteren Prognose und kardialen Leistung verbunden war. Die immunmodulatorischen Effekte der LED-TM in Form einer gesteigerten Zytokinproduktion traten innerhalb weniger Stunden im frühen Krankheitsverlauf auf. Eine vermehrte Infiltration durch neutrophile Granulozyten in Abwesenheit der LED-TM im untersuchten Zeitraum ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auszuschließen. Die Hyperinflammation scheint vielmehr primär regional von den Kardiomyozyten selbst getrieben zu sein, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine gesteigerte Produktion von kardiodepressiven Mediatoren in Folge einer Inflammation bzw. Stimulation zeigten und so autokrine Wirkungen auf die kardiale Leistung produzierten. HMGB1 löste zudem in Kardiomyozyten vergleichbare Expressionsmuster in der inflammatorischen Stressantwort aus wie das Endotoxin Lipopolysaccharid, die in Abwesenheit der LED-TM konsistent verstärkt auftraten. Weiterhin zeigte sich nach polymikrobieller Sepsis eine deutlich positive Korrelation zwischen erhöhten HMGB1-Spiegeln und Troponin I im Plasma nach experimenteller Sepsis. Eine Störung des β -adrenergen Signalweges anhand der durch Phospholamban regulierten Kalziumhomöostase im Myokard zeigte sich unabhängig von der LED-TM ebenfalls früh im Laufe der Sepsis. Die kardiomyozytäre inflammatorische Signaltransduktion über die TLR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genauer aufgeklärt werden.

5.1 LED-TM wirkt protektiv in der Morbidität und Mortalität nach polymikrobieller Sepsis im Mausmodell

Die zugrundeliegende Haupthypothese dieser Arbeit war, dass ein Fehlen der LED-TM mit einem negativen Effekt auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität im Rahmen einer septischen Erkrankung verbunden ist.

Die Resultate zeigen, dass das verwendete polymikrobielle Modell zur Sepsisinduktion zu einer deutlichen systemischen Inflamationsreaktion im Sinne einer schweren Sepsis führte. Diese systemische Inflamationsreaktion trat in den TM^{LeD/LeD}-Tieren mit 6 h nach PCI deutlich früher und insgesamt stärker auf und äußerte sich sowohl in der Ausprägung der Krankheitsschwere anhand des *Clinical Severity Score* (CSS), als auch

in den erhobenen Parametern der Hämatologie und klinisch-chemischen Diagnostik. Neben einer Hypothermie, Leukopenie und Thrombozytopenie, zeigte sich auch eine Leberschädigung und Hinweise auf eine myokardiale Schädigung in beiden Genotypen innerhalb der ersten 12 h nach polymikrobieller Sepsis. Nach 20 bzw. 24 h zeigte sich eine Besserung dieser klinischen Symptomatik unabhängig von der LED-TM. Dieser Erholungseffekt in den untersuchten Populationen kann dem Umstand geschuldet sein, dass viele der akut kranken Tiere bereits innerhalb der ersten 20 h nach Sepsisinduktion verstarben. Die zuvor genannten Punkte zur klinischen Symptomatik bestätigen erwartungsgemäß die Hypothese, dass ein Fehlen der LED-TM mit einem negativen Effekt auf den Krankheitsverlauf während einer polymikrobiellen Sepsis verbunden ist und implizieren den kausalen Zusammenhang des verringerten Überlebens der $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere aufgrund der direkten anti-inflammatorischen Aktivität der LED-TM.

Die beobachtete Überlebensdynamik wies insgesamt keinen deutlichen Überlebensvorteil von weiblichen Individuen auf, wie es in der Literatur berichtet wird (Angele et al. 2014). Hierbei muss einschränkend die Tatsache Berücksichtigung finden, dass für die Studie der genderabhängigen Überlebensvorteile im Tiermodell Weibchen Verwendung finden, die zuvor in ihrem hormonellen Zyklus synchronisiert wurden. Das war in der hier vorliegenden Studie nicht der Fall, um eine generalisierende Aussage über eine heterogene Grundgesamtheit durch die repräsentative Stichprobe zu gewährleisten. Die vorliegende Überlebenszeitanalyse zeigt im Resultat, dass das signifikant verringerte Überleben primär durch das Fehlen der LED-TM begründet ist, da die Summe aller beobachteten Todesereignisse der WT zu keinem Zeitpunkt der Mortalitätsrate der $TM^{LeD/LeD}$ -Tiere entsprach, was auch für die Betrachtung der einzelnen Gender zutrifft. Mit einer Mortalitätsrate von 85% in den $TM^{LeD/LeD}$ und 65% in den WT-Tieren nach bereits 24 h, zeigte die Überlebensanalyse ein vergleichbares prozentuales Überleben wie nach Administration von 40 µg/g i.p. LPS innerhalb von 51 h (Conway et al. 2002). Die Ausprägung einer Sepsis und die Mortalitätsrate sind von einer Vielzahl an Faktoren abhängig, u. a. neben der Dosis auch von dem ausgewählten Modell. Einmalige Endotoxinapplikationen im Tiermodell führen, im Gegensatz zur humanen Sepsis oder polymikrobiellen Sepsismodellen, zu einer sehr schnellen, rapiden und nur kurzfristigen Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Remick und Ward 2005, Dyson und Singer 2009) und reproduzieren weiterhin nicht die hämodynamischen Veränderungen einer humanen Sepsis (Deitch 1998). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete polymikrobielle Sepsismodell bildet die humane Sepsis hingegen besser ab (Gonnert et al.

2011) und zeigte mit 28% eine ähnliche Mortalitätsrate nach 12 h PCI in den Wildtypen wie die initialen Untersuchungen durch Gonnert und Kollegen an Ratten mittels der peritonealen Infektion (15 h Mortalität: 29%), sowie vergleichbare Veränderungen in Parametern der hämatologischen und klinisch-chemischen Diagnostik nach Sepsis (Gonnert et al. 2011, Recknagel et al. 2013).

Die in Bezug auf die Morbidität und Mortalität gewonnenen hypothesengerechte Resultate bestätigen die bereits bekannten protektiven Eigenschaften der LED-TM im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion, die sowohl 2002 in einem murinen Endotoxinschock-Modell gezeigt werden konnten (Conway et al. 2002) als auch in diversen anderen experimentellen Inflammationsmodellstudien (Abeyama et al. 2005, Van de Wouwer et al. 2006, Shi et al. 2008, Zoja et al. 2012).

Zusammenfassend zeigten sich durch die polymikrobielle diffuse Peritonitis in allen Untersuchungstieren deutliche pathophysiologische Effekte, die bereits 12 h nach Insult eine schwere Sepsis indizieren und in den TM^{LeD/LeD}-Tieren zudem früher und in stärkerer Ausprägung auftraten. Die LED-TM wirkt in der polymikrobiellen Sepsis protektiv in der Morbidität und Mortalität.

5.2 Fehlen der LED-TM führt zu einer stärker ausgeprägten kardialen Dysfunktion nach polymikrobieller Sepsis

Die weitere Arbeitshypothese war, dass ein Fehlen der LED-TM die Ausprägung einer kardialen Dysfunktion unterstützt.

Aus den Untersuchungen zur Überlebenszeitdynamik und Krankheitssymptomatik im Mausmodell ergaben sich aus den klinisch-chemischen Parametern bereits erste Hinweise, dass das verwendete kliniknahe polymikrobielle Sepsismodell gemäß der Erwartung mit einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion einhergeht. Die genaue Auswertung der myokardialen Leistung erfolgte anhand der Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve 12 h nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis und in scheinbehandelten Tieren mittels der intrakardialen Konduktanzkatheter-Methode und gilt als Goldstandard der Hämodynamik- und kardialen Funktionsmessung in der Maus (Burkhoff et al. 2005, Pacher et al. 2008). Die Parameter der Herzfunktion zeigten insgesamt eine schwere Einschränkung der myokardialen Leistung nach PCI in beiden Genotypen, wobei sich ein deutlicher Trend für eine stärkere kardiale Depression in den TM^{LeD/LeD} in allen erhobenen Parametern zeigte. Die Zunahme des enddiastolischen Volumens geht nicht mit einer Erhöhung des enddiastolischen Drucks einher, was die

typische Zunahme der ventrikulären *Compliance* im Sinne einer akuten septischen Kardiomyopathie bestätigt (Parillo, 1989). Anhand der relativen Kontraktilitätsabnahme von ca. 40% im Wildtyp und 50% in den TM^{LED/LED} wird die bereits schwere Einschränkung der myokardialen Leistung nach 12 h PCI besonders deutlich. Die hier vorgefundene erwartungsgemäße Ausprägung der hypodynamischen kardialen Dysfunktion ist im Wesentlichen vergleichbar mit derer nach dem *Cecal Ligation and Puncture* polymikrobiellen Sepsismodell (Tao et al. 2004). Die allgemeinen Veränderungen in Form der gesenkten Kontraktilität, der verminderten systolischen und diastolischen Funktion, sowie der Ventrikeldilatation sind klassische Zeichen einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion (Müller-Werdan 1998, Calvin et al. 1981, Knüfermann et al. 2002, Kumar et al. 2004, Rudiger und Singer 2007, Merx und Weber 2007).

Zusammenfassend zeigte sich in diesen Messungen eine deutliche Einschränkung der myokardialen Leistung nach PCI in beiden Genotypen, die bei Fehlen der LED-TM stärker eingeschränkt war. Damit demonstrierten diese Untersuchungen erstmalig die kardioprotektiven Eigenschaften der LED-TM in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie und bestätigt die anfänglich aufgestellte Hypothese, dass ein Fehlen der LED-TM die Ausprägung einer kardialen Dysfunktion verstärkt.

5.3 Die LED-TM verringert die myokardiale Schädigung nach polymikrobieller Sepsis

Aus den zuvor aufgestellten Hypothesen ergab sich die kausal weiterführende Hypothese, dass die LED-TM die myokardiale Schädigung im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis verringert.

Als labormedizinischer Parameter zur Bestimmung myokardialer Schädigung ist vor allem das herzmuskelspezifische Troponin zu erwähnen, da es einen sensitiven Parameter für eine Schädigung des Herzmuskels während einer Sepsis darstellt und gleichzeitig mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Fernandes et al. 1999, ver Elst et al. 2000, Ammann et al. 2001, Mehta et al. 2004, Maeder et al. 2006; John et al. 2010, Landesberg et al. 2012). Erhöhungen von kardialem Troponin I vermag nicht nur eine kardiale Dysfunktion zu indizieren, sondern wird auch als prognostischer Marker in der klinischen Routine zur Bestimmung von kritisch kranken Patienten empfohlen (Fernandes et al. 2008b). Die Analyse der Plasmaproteinlevel für kardiales Troponin I zeigte, analog zu den bereits gezeigten frühen und stärker ausgeprägten pathophysiologischen Effekten bei Fehlen der LED-TM, eben-

falls 6h nach PCI in den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren signifikant erhöhte Werte und indizieren damit eine vermehrte myokardiale Schädigung bei Fehlen der LED-TM. Diese vermehrte myokardiale Schädigung findet bereits innerhalb der ersten Stunden der Inflamationsreaktion statt und verdeutlicht nochmals die veränderte Dynamik der Wirtsantwort in Abwesenheit der LED-TM und die modulatorischen Effekte dieser im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie. Ein Anstieg des herzspezifischen Laborparameters Troponin I findet sich bei 50 bis 85% der Patienten mit Sepsis und septischen Schock sowie im experimentellen Tiermodell und ist zu 80% mit einer linksventrikulären Dysfunktion assoziiert (Fernandes et al. 1999, ver Elst et al. 2000, Ammann et al. 2001, Landesberg et al. 2012, Zhao et al. 2015). Jedoch reflektieren diese Erhöhungen nicht einen irreversiblen Herzschaden (Wu 2001), da im Rahmen der reversiblen septischen Kardiomyopathie mehrheitlich eher funktionelle als strukturelle Veränderungen, wie vermehrte Apoptose oder Nekrose im Myokard, angenommen werden (Rudiger und Singer 2007, Zaky et al. 2014). In Übereinstimmung dazu zeigten die histopathologischen Untersuchungen an dem Herzgewebe der PCI-behandelten Untersuchungstiere einen unauffälligen Befund, sowohl die allgemeine Architektur des Myokards betreffend als auch die Beurteilung kardiomyozytärer apoptotischer Ereignisse. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Mehrheit der Untersuchungen sowohl im Patienten mit septischen Schock als auch aus tierexperimentellen Studien (ver Elst et al. 2000, Soriano et al. 2006, Rossi et al. 2007, Carlson et al. 2005). Die beobachtete verstärkte myokardiale Schädigung ist demnach nicht maßgeblich durch kardiomyozytäre Apoptose verursacht. Eine Erklärung für die vermehrt nachweisbare myokardiale Schädigung, könnte ein erhöhtes Vorkommen von Einzelzellnekrose sein, die hier zwar nicht untersucht wurde, aber in einer *post-mortem* Studie an septischen Patienten mit kardiovaskulärem Versagen festgestellt wurde. Dort fanden sich in allen histologischen Präparaten pathologische Nachweise von Nekrosen in den kontraktile Banden und Myozytolyse (Schmittinger et al. 2013). Weiterhin gilt zu beachten, dass in den hier vorliegenden Untersuchungen insgesamt eine vermehrte iNOS-Expression im Myokard nach PCI festzustellen war, die durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen den Abbau von Myofilamenten initiiert (Kohr et al. 2012). In diesem Zusammenhang steht auch die interessante Beobachtung zur Diskussion, dass sich apoptotische Zellkerne vornehmlich im endothelnahen Bereich von kleineren Koronargefäßen des Myokards befanden, wobei diese Verteilung nicht auf einwandernde Immunzellen zurückzuführen ist. Denkbar wäre eine vermehrte Störung der zellulären Integrität von Endothelzellen in Abwesen-

heit der LED-TM. Bereits 2002 wurde im LPS-Modell gezeigt, dass ein Fehlen der LED-TM zu einer vermehrten Aktivierung von extrazellulären signalregulierten Kinasen durch Phosphorylierung führte (Conway et al. 2002). Die vermehrte Apoptose im Bereich dieser vaskulären Strukturen lässt weiterhin eine gestörte Mikrozirkulation am Myokard vermuten, die im Zusammenhang mit der Pathogenese einer septischen Kardiomyopathie diskutiert wird (Groeneveld et al. 1991, Rudiger und Singer 2007).

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Untersuchung eine erhebliche myokardiale Schädigung, die in Abwesenheit der LED-TM bereits innerhalb der ersten Stunden nach polymikrobieller Sepsis nachweisbar ist. Damit bestätigen diese Untersuchungen die anfänglich aufgestellte Hypothese, dass die Verfügbarkeit der LED-TM die myokardiale Schädigung verringert und demonstriert ebenfalls die kardioprotektiven Eigenschaften der LED-TM in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie.

5.4 Fehlen der LED-TM verstärkt die frühe systemische und myokardiale Inflamationsantwort

Eine wesentliche und gut belegte Ursache für die Ausprägung einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion ist auf die Aktivität von Zytokinen als kardiodepressive Mediatoren (KDM) zurückzuführen (Kumar et al. 1996, Kojda und Kottenberg 1999, Rudiger und Singer 2007). Daher war eine weitere Hypothese, dass ein Vorhandensein der LED-TM durch seine anti-inflammatorische Aktivität die systemische und/oder myokardiale Inflamationsantwort verringert. Dabei sind hauptsächlich Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , IL-6 und MCP-1 von Bedeutung (Liu und Schreuer 1995, Krown et al. 1995, Lew et al. 1996, Oral et al. 1997, Ziolo et al. 2001a), die in der vorliegenden Arbeit sowohl im Kreislauf als auch im Myokard und in isolierten Kardiomyozyten genauer untersucht wurden. Als Anti-inflammatorisches Protein wurde IL-10 untersucht.

Die Ergebnisse zeigen immunmodulatorische Effekte der LED-TM in Form einer gesteigerten pro-inflammatorischen Zytokinproduktion, die, analog zur klinischen Symptomatik, innerhalb weniger Stunden im frühen Krankheitsverlauf auftraten und ebenso eine Minderung innerhalb von 24 h zeigten. In der Zytokinfreisetzung zeigte sich sowohl im Kreislauf als auch im Myokard ein ähnliches Regulationsprofil, wobei eine gesteigerte myokardiale mRNA-Expression dieser Zytokine mit den absoluten Proteinquantifizierungen im Myokard korrespondierten. Im Wesentlichen zeigte sich eine vermehrte Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und MCP-1 nach 6 h polymikrobieller Sepsis in den TM^{LeD/LeD}. Weiterhin zeigten sich TNF- α und IL-10 nach polymikrobieller Sepsis

reguliert, allerdings im Vergleich zu den zuvor genannten KDM vergleichsweise mild und ohne einen Zusammenhang zur LED-TM. Die gemessene Zytokinfreisetzung im Plasma ist zwar geringer als ursprünglich durch Conway im LPS-Modell nach 6 h in den $TM^{LeD/LeD}$ gezeigt (Conway et al. 2002), spiegelt aber den gleichen Effekt durch die LED-TM wieder, abgesehen von der $TNF-\alpha$ Freisetzung. Da $TNF-\alpha$ ein früh auftretendes Zytokin während der hyperinflammatorischen Phase darstellt, mit maximaler Freisetzung von 1 bis 3 h nach Insult (Zhu et al. 2010), ist naheliegend, dass die gewählten Untersuchungszeitpunkte den $TNF-\alpha$ Peak nicht adäquat abbilden. Ähnliches gilt für IL-10, da im PCI-Modell bereits ein deutlich früherer Anstieg (1,5 h nach Sepsis) gezeigt worden ist (Recknagel et al. 2013), die eine rapide Initiierung der anti-inflammatorischen Wirtsantwort gemäß aktuellem Verständnis der Immunparalyse durch Sepsis bestätigen (Osuchowsky et al. 2006, Angus und van der Poll 2013).

Die Aktivierung des Endothels und von zirkulierenden Monozyten sowie neutrophilen Granulozyten als Teil der Immunantwort des Wirts in Folge der Sepsis, führt zu einer Einwanderung von Immunzellen in die betroffenen Gewebe und einer vermehrten Freisetzung von pro-inflammatorisch wirkenden Mediatoren in den Kreislauf (Arras et al. 1996, Faix 2013). Insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bereits eine vermehrte Expression von vaskulären und interzellulären *Cell Adhesion Molecules* (CAM) in Herzlysaten der $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren vor und 3 h nach LPS beschrieben wurde, die stressinduziert durch Phosphorylierung von extrazellulären signalregulierten Kinasen zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten an das aktivierte Endothelium führt (Conway et al. 2002, Van de Wouwer und Conway 2004), stellte sich die Frage, inwieweit die beobachtete frühe myokardiale Inflamationsantwort bereits durch infiltrierende Immunzellen beeinflusst wurde. Dieser Prozess war im hier angewandten Modell jedoch offensichtlich von nachrangiger Bedeutung, da eine vermehrte Infiltration des Myokards durch neutrophile Granulozyten unabhängig von der LED-TM im untersuchten Zeitraum auszuschließen ist. Zwei erst kürzlich veröffentlichte Studien mit den $TM^{LeD/LeD}$ -Tieren zeigten in Übereinstimmung zu diesen Resultaten ebenfalls keine Unterschiede in der Neutrophileninfiltration nach gram-negativer Infektion (Kager et al. 2014b) oder gram-positiver Infektion der Atemwege (Kager et al. 2014 a). Es sollte hier nicht unerwähnt bleiben, dass die eigene Auswertung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Leber und Niere ebenfalls keinen Unterschied zwischen Wildtypen und $TM^{LeD/LeD}$ ergab. Dabei zeigte zumindest die Infiltration der Leber einen drastischen Anstieg von Immunzellen nach PCI, wobei eine leukozytäre Invasion der Leber

bereits nach 5 h sowohl im PCI und LPS-Modell beschrieben wurde (Recknagel et al. 2013). Insgesamt zeigte sich im Rahmen des angewandten Sepsismodells also keine veränderte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit der LED-TM zu den untersuchten Zeitpunkten. Unter pathophysiologischen Bedingungen bilden Kardiomyozyten selbst, unabhängig von den Zellen des Immunsystems, pro-inflammatorische Mediatoren und fungieren dadurch als immunaktive Zellen (Kapadia et al. 1995, Meldrum 1998, Müller-Werdan und Werdan 2001, Flierl et al. 2008). Neben den systemisch gebildeten pro-inflammatorischen Botenstoffen stellt die lokale myokardiale Produktion dieser ebenfalls eine autokrine Quelle kardiodepressiv wirkender Mediatoren dar. Die Hyperinflammation scheint in der vorliegenden Studie daher primär regional von den Kardiomyozyten selbst getrieben zu sein, da sich *in vitro* nach 6 h Stimulation ein ähnliches Regulationsprofil zeigte, dass vor allem für IL-1 β prominente Hochregulationen offenbarte. Aus der umfangreichen Literatur zur Expression und Regulation von TM ist bekannt, dass es unter inflammatorischen Bedingungen durch pro-inflammatorische Mediatoren, wie IL-1 β , TNF- α und Endotoxin, innerhalb von wenigen Stunden herabreguliert und durch Endozytose internalisiert wird (Conway und Rosenberg 1988, Moore et al. 1989, Boehme et al. 1996, Sohn et al. 2005, Kim et al. 2007, Conway 2012). Die löslichen Fragmente von TM zeigen geringere Aktivität als membran gebundenes TM (Uehara et al. 2001, Ohlin et al. 2005, Miwa et al. 2015), was als ursächlich für die hier vorgefundenen zeitabhängigen Effekte der LED-TM angenommen werden kann.

Zusammenfassend identifizierten die vorliegenden Untersuchungen erstmalig die anti-inflammatorischen Eigenschaften der LED-TM in Form einer modulierten Zytokinfreisetzung mit kardiodepressiven Potential und zu einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion während einer polymikrobiellen Sepsis beitragen. Dabei demonstrierten die Ergebnisse, dass die Kardiomyozyten selbst einen entscheidenden Beitrag zu der pro-inflammatorischen Antwort leisten. Die LED-TM verringert die systemische und myokardiale Inflamationsantwort.

5.5 TM-LED moduliert die Verfügbarkeit von freiem HMGB1

Eine weitere zentrale Hypothese dieser Arbeit war, dass die durch die LED-TM verursachten positiven Effekte vornehmlich durch die Modulation der Verfügbarkeit von freiem HMGB1, als kardiodepressiv wirkendem Mediator, vermittelt werden.

Es zeigten sich *in vivo* deutlich erhöhte Werte von frei verfügbarem, kardiodepressiv wirkenden HMGB1 in Abwesenheit der LED-TM mit der gleichen zeitlichen Dynamik der anderen Zytokine nach 6 h PCI. Xu und Kollegen zeigten 2010 nicht nur das intakte Kardiomyozyten in der Lage sind HMGB1 zu sezernieren, sondern auch in einer Korrelationsanalyse zwischen frei verfügbaren HMGB1 und der myokardialen Kontraktilität (ESPVR) eine deutliche Assoziation von erhöhten HMGB1 Werten im Plasma mit einer gesenkten myokardialen Leistung, die bereits innerhalb 1 h dieselben gravierenden Einschränkungen auf die Kontraktilität verursachten wie LPS. In Ermangelung eines direkten Parameters der myokardialen Leistung nach PCI, erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen HMGB1 und Troponin I, da eine Erhöhung von kardialen Troponin I eine kardiale Dysfunktion indiziert (Fernandes et al. 1999, ver Elst et al. 2000, Ammann et al. 2001, Landesberg et al. 2012). Es zeigten sich deutlich positive Korrelationen zwischen HMGB1 und Troponin nach Sepsis (Spearman Correlation Coefficient $r = 0,7653$) mit zusätzlich deutlich höheren Werten in Abwesenheit der LED-TM. Hierin wird deutlich, dass bei einer Erhöhung von HMGB1 im Blutstrom, kardiales Troponin ebenfalls erhöht vorliegt und damit eine kardiale Dysfunktion wahrscheinlich ist. Dies indiziert eine maßgebliche Rolle von HMGB1 im Rahmen der hier vorgefundenen kardialen Depression nach PCI. Weiterhin weisen die in der hier vorliegenden Studie gemessenen freien HMGB1 Konzentrationen annähernd ähnlich hohe Konzentrationen auf wie jene, die 2010 mit dem akuten kontraktilitätseinschränkenden Effekt von HMGB1 assoziiert werden konnten (Xu et al. 2010) und lassen daher die Interpretation zu, dass freies HMGB1 die hier beobachteten immunomodulatorischen Effekte der LED-TM maßgeblich beeinflusst.

HMGB1 wird als ein verhältnismäßig später Mediator der Inflammation angesehen, da signifikante Plasmaspiegel erst einige Stunden nach anderen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β detektiert werden (Yang et al. 2005). Daher liegt die Vermutung nahe, dass HMGB1 in Folge dieser anderen Zytokine, als endogenes Alarmin aus aktivierten Immunzellen sezerniert wurde oder von nekrotischen Zellen freigegeben wurde (Chen et al. 2004, Yin et al. 2005, Yang et al. 2005, Bianchi 2007, Zhu et al. 2010). Dementsprechend ist in der hier vorliegenden Arbeit die erhöhte HMGB1 Freisetzung zu dem beobachteten frühen Zeitpunkt vorrangig aus Leukozyten, der Leber und aber auch dem Myokard wahrscheinlich, da sich hier bereits deutliche Pathologien zu diesem frühen Zeitpunkt erkennen ließen. Über längerfristige Freisetzungen von HMGB1 und die dadurch möglichen Komplikationen kann, aufgrund des gewählten Untersuchungszeitraums

in der vorliegenden Arbeit, keine Aussage getroffen werden. Um weiterhin die direkten Effekte von HMGB1 auf die kardiomyozytäre immunomodulatorische Funktion zu untersuchen, erfolgte die vergleichende Stimulation von primären adulten Kardiomyozyten mit HMGB1 und/oder LPS. HMGB1 löste in den Kardiomyozyten vergleichbare Expressionsmuster in der inflammatorischen Stressantwort aus wie das Endotoxin LPS, die in Abwesenheit der LED-TM konsistent verstärkt auftraten ohne deutlich additive Effekte bei einer Ko-Stimulation.

Die Anstiege des frei verfügbaren HMGB1 im polymikrobiellen Sepsismodell sowie die regelhaften und sehr gut vergleichbaren Effekte in der *in vitro* Zytokinproduktion unabhängig vom verwendeten inflammatorischen Stimulus, die sich in Abwesenheit der LED-TM zeigten, bestätigen die initiale Hypothese.

Da die LED-TM durch Bindung von HMGB1 auch in Kardiomyozyten eine wesentliche anti-inflammatorische Rolle einnimmt, konnte bereits im Rahmen von myokardialer Ischämie und Reperfusion gezeigt werden (Herzog et al. 2014). Die hier gezeigten Effekte erweitern diese Kenntnisse. Die LED-TM vermittelt auch im Rahmen einer sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion im Myokard anti-inflammatorische Eigenschaften, indem sie gleichermaßen als Bindungspartner für HMGB1 und LPS fungiert.

5.6 Molekulare Merkmale der sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion

5.6.1 Modifikation der Kalziumhomöostase durch Phospholamban

Als zentrale negativ inotrope Achse während der Ausprägung einer sepsis-assoziierten kardialen Dysfunktion wird eine gestörte β -adrenerge Signaltransduktion beschrieben (Müller-Werdan et al. 1997, Rudiger und Singer 2013), die sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in humanen Studien gezeigt werden konnte (Sande et al. 2002, Schwinger et al. 1999). Die hier gemessenen verminderten kontraktile Eigenschaften, sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion betreffend, lassen eine gestörte Kalziumhomöostase während der Kontraktion im Myokard vermuten.

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von PLN, als entscheidendem Regulator des intrazellulären Kalziumtransports und der β -adrenergen Signaltransduktion über die cAMP induzierte PKA Aktivität, bestätigte diese Annahme. Es zeigte sich, dass PLN ungeachtet vom Fehlen der LED-TM in der frühen Phase nach Sepsisinduktion (6 und 12 h) konsistent hypophosphoryliert vorlag, im Vergleich zu der entsprechenden unbe-

handelten Kontrolle. Der durch die Hypophosphorylierung verminderte Kalziumflux in das Sarkoplasmatische Retikulum resultiert in einer verlängerten Relaxationszeit, einer reduzierten Kontraktilität durch die verminderte Kalziumverfügbarkeit aus diesem Reservoir und in einer daraus resultierenden kardialen Dysfunktion (MacLennan und Kranias 2003). Neben dieser generellen Störung in Verbindung mit dem septischen Insult, zeigte die densitometrische Quantifizierung keinen maßgeblichen Effekt der LED-TM, so dass eine cAMP-abhängige Signaltransduktionsstörung während der septischen kardialen Dysfunktion nicht als ursächlich für die insgesamt stärker ausgeprägte myokardiale Leistungseinschränkung in den TM^{LeD/LeD} bestätigt werden kann. Eine weitere gut belegte Ursache für eine inflammationsbedingte Depression der Kontraktilität ist die durch vermehrte Expression von iNOS und nachfolgenden NO- sowie Peroxynitrit vermittelte Senkung der PLN-Phosphorylierung (Kohr et al. 2008, Ziolo et al. 2008, Kohr et al. 2009, Kohr et al. 2012). Neben einer iNOS bzw. NO vermittelten Senkung der PLN-Phosphorylierung, sind cGMP-abhängige Signalwege bekannt, die über eine Aktivierung von Guanylatzyklase und Protein Kinase G (PKG) zum einen zu einer Troponin-I-Phosphorylierung durch PKG führen können (Layland et al. 2002) und dadurch eine Reduktion der Kalziumsensitivität der Myofilamente verursachen (Yasuda und Lew 1997) und außerdem eine Inhibition des L-Typ-Kalziumkanals verursacht (Ziolo et al. 2001a). In Ergänzung zu der Analyse des Phosphorylierungsstatus von PLN zeigte sich in den hier vorliegenden Untersuchungen eine vermehrte iNOS-mRNA-Expression im Myokard, die ebenfalls unabhängig von der LED-TM nach PCI war.

Somit konnte anhand der eigenen Untersuchungen keine spezifische LED-TM-abhängige Beeinflussung der eingeschränkten kardialen Kontraktion im Rahmen der Sepsis anhand von molekularer Modifikation der Kalziumhomöostase verifiziert werden.

5.6.2 Signaltransduktion durch *Toll-like-Rezeptoren*

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte die kausale Beziehung zwischen einer aktivierten myokardialen Immunantwort in Form einer vermehrten TLR-abhängigen Signaltransduktion und einer begleitenden Dysregulation in der β -adrenergen PKA abhängigen Signaltransduktion (Singer et al. 2013). TLR sind im Herzen vorhanden und nehmen dort eine zentrale Rolle bei jeglicher Reaktion auf zellulären Stress ein (Knufermann et al. 2004b). TLR4 ist ein membranständiger Rezeptor für Zellwandbestandteile von gramnegativen Organismen (LPS/Lipopolysaccharid-bindendes Protein Kom-

plex) und TLR2 für Zellwandbestandteile von grampositiven Organismen (Knuefermann et al. 2002, Knuefermann et al. 2004a). HMGB1 bindet als endogener Ligand an TLR2 und TLR4 und initiiert so die inflammatorische Signalkaskade (Akira 2009). Daher lautete eine weitere Arbeitshypothese, dass die zugrundeliegende proinflammatorisch wirkende Signalkaskade in Abhängigkeit der LED-TM im Myokard durch eine Beteiligung der Rezeptoren TLR2 und/oder TLR4 erfolgt.

Die hier vorliegenden Ergebnisse aus den PCI Studien belegten eine vermehrte TLR2 und TLR4 Expression im Rahmen des septischen Insults im Myokard mit nachgeschaltet aktivierten Transkriptionsfaktoren MyD88 und NF-kappaB, sowohl durch die myokardiale mRNA-Expressionsanalyse als auch die Expressionsanalyse auf Proteinebene mittels Western Blot für TLR4. Hierbei zeigte besonders TLR4, gemäß den bereits gezeigten frühen und stärker ausgeprägten hyperinflammatorischen Effekten bei Fehlen der LED-TM, nach 6 h PCI einen signifikanten Anstieg für die TM^{LeD/LeD}-Tiere in der myokardialen mRNA-Expressionsanalyse. Die Ergebnisse implizieren somit erwartungsgemäß eine Beteiligung beider Rezeptoren im Rahmen der pro-inflammatorischen Signaltransduktion im Myokard, wie sie auch schon nach 6 h polymikrobieller Sepsis nachgewiesen wurden (Singer et al. 2013), und erweitert diese hierbei um die Erkenntnisse zu den modulatorischen Kapazitäten der LED-TM im Rahmen der Signaltransduktion.

Um diese myokardialen Signalwege der Immunantwort in Abhängigkeit von der LED-TM genauer zu untersuchen, erfolgten *in vitro* Stimulationsversuche mit einem Zytokinmix (ZM) an primären Kardiomyozyten, nach Transfektion mit TM bei gleichzeitiger siRNA-vermittelten Degradierung dieser Rezeptoren. Der ZM bildet das klinische Bild von septischen Plasma weitgehend ab und initiiert ein gut vergleichbares Muster in der Regulation der myokardialen Immunantwort, verglichen mit dem von Herzen nach PCI (Lemm 2015). Durch die Transfektion konnte sowohl die Plasmid-DNA als auch die siRNA in einem kombinierten Transfektionsschritt, unter geringfügigen zytotoxischen Effekten erfolgreich, in die Zellen transferiert werden, verbunden mit maximaler Transfektionseffizienz. Eine Überexpression von TM konnte mit einer relativen Expressionszunahme von $63,4 \pm 9,2\%$ im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle erreicht werden. Ein direkter Vergleich dieses Transfektionserfolges ist anhand der Literatur nicht möglich, da die Arbeitsgruppe um Herzog zum einen eine HL-1 Zelllinie zur Transfektion verwendet hat und zum anderen keine genauen Angaben zur erreichten Transfektionseffizienz gemacht hat (Herzog et al. 2014). Die generelle Transfektionsef-

fizienz in primären Kardiomyozyten verglichen mit immortalisierten Zelllinien oder anderen Transfermethoden wird aber als eher gering beschrieben (Tashiro et al. 2005, Lan et al. 2009, Louch et al. 2011). Trotzdem wird der hier erzielte Transfektionserfolg mit ca. 65% Überexpression von TM als vergleichsweise hoher Transfektionserfolg in den neonatalen Kardiomyozyten gewertet, da von Effizienzen um 25% bei liposomaler Transfektion berichtet wurde (Lan et al. 2009). Die Analyse der siRNA vermittelten Degradierung von TLR2 und TLR4 zeigte eine Expressionsminderung von 70-80% (TLR2 *Ratio* $0,31 \pm 0,05$; TLR4 *Ratio* $0,21 \pm 0,02$) und ist damit sogar etwas besser als die bereits beschriebene siRNA-vermittelte Degradierung von ca. 70% für TLR2 und TLR4 nach 72 h in adulten Kardiomyozyten (Herzog et al. 2014).

Entgegen der Erwartungen konnte die kardiomyozytäre inflammatorische Signaltransduktion über die TLR, im Rahmen der nachgängigen Stimulation, nicht genauer aufgeklärt werden, da die Ergebnisse in Bezug auf die anti-inflammatorische Wirkung der LED-TM widersprüchliche Resultate zeigten. Betrachtet man die Zytokinregulationen anhand des ausgewählten Parameters IL-6 bei Überexpression von vollständigem humanen TM, so zeigten sich erstmal erwartungsgemäße Minderungen in der Regulation dieses Zytokins, die sich bei gleichzeitiger Degradierung von TLR2 deutlicher darstellen, jedoch nicht bei einer Degradierung von TLR4 fortbestanden. Anhand dieser Regulationsmuster lässt sich der anti-inflammatorische Charakter von TM erkennen, der sich nur bei gleichzeitiger TLR2 Degradierung signifikant darstellt. Diese Ergebnisse lassen sich, trotz fehlender Signifikanzen zu den anderen Rezeptoren, erstmal generell mit denen von Herzog et al. (2014) vergleichen und daher auf eine TLR2 vermittelte Signalisierung schließen, allerdings in einem anderen Stimulationsmodell. Demgegenüber zeigte die ergänzende Analyse zur Überexpression von humanem TM ohne LED-TM in den hier durchgeführten Versuchen widersprüchliche Ergebnisse. Es zeigte sich weder eine vermehrte Regulation dieses Zytokins gegenüber derer von vollständigem TM noch war eine Expressionsminderung bei Degradierung von TLR2 oder TLR4 zu beobachten. Man könnte hier erstmal vermuten, dass TM unabhängig von der LED-TM indirekte anti-inflammatorische Eigenschaften vermittelt. Allerdings zeigte die Analyse von weiteren inflammations-assoziierten Zytokinen deutliche expressionsmindernde Effekte, die vermutlich durch die generelle Transfektion der Zellen, ebenfalls unabhängig vom Vorhandensein der LED-TM, verursacht worden sind. Vermehrter Zelluntergang durch die Transfektion erscheint als Erklärung von untergeordneter Rolle, aufgrund der geringen gemessenen LDH-Ausschüttungen. Eine mögliche Erklärung kann

in einer Präkonditionierung der Zellen durch den Transfektionsstress gesucht werden, wie sie beispielsweise durch eine Vorbehandlung mit LPS bereits auf Ebene der Myozyten durch eine reduzierte myokardiale Inflammation und Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis gezeigt wurde (Neviere et al. 1999). Obwohl sich *in vitro* eine tendenziell stärkere Milderung der Expressionsänderungen in Abhängigkeit von TM bei einer simultanen siRNA-Transfektion gegen TLR2 erkennen ließ, lassen die vorliegenden Daten, keine zuverlässigen Rückschlüsse auf dessen Beteiligung während der Signaltransduktion zu. Ergänzend sollten auch alternative Rezeptoren für HMGB1, wie RAGE oder der IL-1-Rezeptor in zukünftigen Untersuchungen Berücksichtigung finden, da in Literatur beschrieben wurde, dass HMGB1 durch Bindung an endogene Zytokine wie IL-1 β und dessen Rezeptorinteraktion, erhöhte pro-inflammatorische Aktivität aufweist (Sha et al. 2008) und sich dieses Zytokin in den vorliegenden Untersuchungen durchweg prominent in Abhängigkeit von der LED-TM in Erscheinung trat.

Zusammenfassend zeigte sich erwartungsgemäß eine vermehrte Regulation der vermuteten Rezeptoren TLR2 und TLR4 im Myokard nach polymikrobieller Sepsis, wobei sich *in vivo* deutliche Hinweise auf eine TLR4 Beteiligung und *in vitro* schwache Hinweise auf eine TLR2 Beteiligung in der Signaltransduktion in Abhängigkeit der LED-TM zeigten. Die zugrundeliegende pro-inflammatorisch wirkende Signalkaskade in Abhängigkeit der LED-TM im Myokard, kann daher nur eingeschränkt auf eine Beteiligung der Rezeptoren TLR2 und/oder TLR4 zurückgeführt werden.

6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit charakterisiert erstmalig die Rolle der LED-TM in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie im murinen Sepsismodell.

Die Untersuchungen zeigen, dass ein Fehlen der LED-TM sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einer verstärkten Inflamationsreaktion sowie *in vivo* mit einer schlechteren Prognose und kardialen Leistung verbunden ist. Eine Störung des β -adrenergen Signalweges anhand der durch Phospholamban regulierten Kalziumhomöostase im Myokard zeigt sich unabhängig von der LED-TM in den ersten Stunden einer Sepsis. Die Ergebnisse offenbaren eine vermehrte Dysregulation der globalen und kardialen Inflamationsantwort bei Fehlen der LED-TM, welche sich in einem vermehrten Anstieg kardio-depressiver pro-inflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen und dem endogenen Alarmin HMGB1 ebenfalls in den ersten Stunden des Krankheitsverlaufs manifestiert. Eine vermehrte Infiltration durch neutrophile Granulozyten in Abwesenheit der LED-TM ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als Ursache für die veränderte Dynamik der frühen Inflamationsreaktion im Myokard auszuschließen. Die Hyperinflammation scheint vielmehr primär regional von den Kardiomyozyten selbst getrieben zu sein, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine gesteigerte myokardiale Produktion von kardio-depressiven Mediatoren in Folge einer Inflammation bzw. Stimulation zeigen. HMGB1 löst zudem in Kardiomyozyten vergleichbare Expressionsmuster in der inflammatorischen Stressantwort aus wie das Endotoxin Lipopolysaccharid, welche in Abwesenheit der LED-TM konsistent verstärkt ist. Diese raschen Anstiege in der Inflamationsantwort in Abwesenheit der LED-TM korrelieren *in vivo* mit einer erhöhten myokardialen Schädigung gemessen am Troponin I. Weiterhin zeigt sich *in vivo* eine deutlich positive Korrelation zwischen erhöhten HMGB1-Spiegeln und Troponin I im Plasma nach experimenteller Sepsis.

Der anti-inflammatorische Effekt der LED-TM lässt sich daher als ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebener, wesentlicher Modulator für die Kardiomyozytenintegrität und Herzfunktion während des septischen Krankheitsgeschehens festhalten. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen damit die bisherigen Erkenntnisse zur allgemeinen anti-inflammatorischen Wirkung der LED-TM im Rahmen von einer Reihe inflammato-

rischer Krankheitsmodelle und erweitern diese zusätzlich um die hier beschriebenen Erkenntnisse zum modulatorischen Einfluss im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie. Die kardiomyozytäre Signaltransduktion der stärkeren und veränderten Dynamik in der Inflamationsantwort in Abhängigkeit von der LED-TM über die TLR konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Aufgrund der vielversprechenden Resultate dieser Arbeit, sollte weitere Forschungsarbeit angestrebt werden, um die molekularen Mechanismen der gezeigten Hyperinflammation bei der sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion in Abhängigkeit von der LED-TM weiter aufklären zu können. Die Effekte von rTM, bestehend aus der LED-TM oder auch dem gesamten Protein, als potentiell Therapeutikum während der sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion sollten zukünftig Berücksichtigung finden.

Vor allem im Hinblick auf die potentiellen protektiven Effekte von rTM im septischen Patienten sind die Ergebnisse der Phase III klinischen Studie, die momentan in den USA durchgeführt wird, mit Spannung zu erwarten. Retrospektive Beobachtungsstudien mit septischen Patienten die innerhalb dieser Studie eine kardiale Dysfunktion aufweisen, bieten darüber hinaus die Möglichkeit die hier beobachteten potentiell protektiven Effekte der LED-TM in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie risikoarm im Patienten zu überprüfen und gleichzeitig die klinische Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse zu studieren.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Empfehlungen, dass zum einen kardiales Troponin I als ein früher prognostischer Marker in der klinischen Routine zur Bestimmung von kritisch kranken Patienten inkludiert werden könnte und weiterhin, aufgrund der deutlich positiven Korrelation zwischen HMGB1 und Troponin nach Sepsis, freies HMGB1 ebenfalls als ergänzender Marker in der klinischen Routine Verwendung finden könnte.

Zusammenfassend bieten die hier gewonnenen Erkenntnisse über die modulatorischen Effekte der LED-TM bei der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie der kardialen Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abe H**, Okajima K, Okabe H, Takatsuki K, Binder BR. **1994**. Granulocyte proteases and hydrogen peroxide synergistically inactivate thrombomodulin of endothelial cells in vitro. *J Lab Clin Med*, 123(6):874-81.
- Abeyama K**, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Iino S, Taniguchi N, Maruyama I. **2005**. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest*, 115(5):1267-74.
- Abraham E**, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, Beale R, Svoboda P, Larterre PF, Simon S, Light B, Spapen H, Stone J, Seibert A, Peckelsen C, De Deyne C, Postier R, Pettilä V, Artigas A, Percell SR, Shu V, Zwingelstein C, Tobias J, Poole L, Stolzenbach JC, Creasey AA; OPTIMIST Trial Study Group. **2003**. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 290(2):238-47.
- Akira S**. **2009**. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(4):143-56. Review. Erratum in: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(6):216.
- Ammann P**, Fehr T, Minder EI, Günter C, Bertel O. **2001**. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, 27(6):965-9.
- An G**, Namas RA, Vodovotz Y. **2012**. Sepsis: from pattern to mechanism and back. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(4):341-51. Review.
- Angele MK**, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. **2014**. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*, 5(1):12-9. Review.
- Andersen CL**, Jensen JL, Ørntoft TF. **2004**. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64(15):5245-50.
- Angus DC**, Wax RS. **2001**. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl): S109-16.
- Angus DC**, van der Poll T. **2013**. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369 (21): 2063.
- Annane D**, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P. **1999**. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(2):458-65.
- Annane D**, Timsit JF, Megarbane B, Martin C, Misset B, Mourvillier B, Siami S, Chagnon JL, Constantin JM, Petitpas F, Souweine B, Amathieu R, Forceville X, Charpentier C, Tesnière A, Chastre J, Bohe J, Colin G, Cariou A, Renault A, Brun-Buisson C, Bellissant E; AP-ROCCHSS Trial Investigators. **2013**. Recombinant human activated protein C for adults with septic shock: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 187(10):1091-7.
- Arras M**, Höche A, Bohle R, Eckert P, Riedel W, Schaper J. **1996**. Tumor necrosis factor-alpha in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland. *Cell Tissue Res*, 285(1):39-49.
- Azimi G**, Vincent JL. **1986**. Ultimate survival from septic shock. *Resuscitation*, 14(4):245-53.
- Barth E**, Radermacher P, Thiernemann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G. **2006**. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to cate-

- cholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*, 34(2):307-13.
- Bergquist J**, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. **1994**. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26):12912-6.
- Bernard GR**, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. **2001**. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344(10):699-709.
- Bernardin G**, Strosberg AD, Bernard A, Mattei M, Marullo S. **1998**. Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. *Intensive Care Med*, 24(12):1315-22.
- Bers DM**. **2002**. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868):198-205. Review.
- Bianchi ME**. **2007**. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81(1):1-5.
- Böhm M**, Kirchmayr R, Gierschik P, Erdmann E. **1995**. Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. *Am J Med*, 98(2):183-6.
- Bocking JK**, Sibbald WJ, Holliday RL, Scott S, Viidik T. **1979**. Plasma catecholamine levels and pulmonary dysfunction in sepsis. *Surg Gynecol Obstet*, 148(5):715-9.
- Boehm O**, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. **2007**. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem*, 388(5):547-54. Erratum in: *Biol Chem*, 388(11):1255-6.
- Boehme MW**, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, Nawroth PP. **1996**. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology*, 87(1):134-40.
- Bone RC**. **1991**. Gram-negative Sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest*, 100(3):802-8.
- Bone RC**, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. **1992**. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6):1644-55.
- Brookes PS**. **2004**. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*, 3(4):187-204.
- Brunkhorst FM**. **2006**. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfall-med Schmerzther*, 41(1):43-4.
- Brunkhorst FM**, Meier-Hellmann A, Reinhart K. **2007**. Therapie des septischen Kreislaufversagens. *Ärzteblatt Thüringen*, 7-8:418-422.
- Burkhoff D**, Mirsky I, Suga H. **2005**. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(2):H501-12.
- Calvin JE**, Driedger AA, Sibbald WJ. **1981**. An assessment of myocardial function in human sepsis utilizing ECG gated cardiac scintigraphy. *Chest*, 80:579-586.
- Carlson DL**, Willis MS, White DJ, Horton JW, Giroir BP. **2005**. Tumor necrosis factor-alpha-induced caspase activation mediates endotoxin-related cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 33(5):1021-8.
- Cavaillon JM**, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. **2003**. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*, 35(9):535-44. Review.

- Cerra FB. 1985.** The systemic septic response: multiple systems organ failure. *Crit Care Clin*, 1(3):591-607. Review.
- Chen G, Li J, Ochani M, Rendon-Mitchell B, Qiang X, Susarla S, Ulloa L, Yang H, Fan S, Goyert SM, Wang P, Tracey KJ, Sama AE, Wang H. 2004.** Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms. *J Leukoc. Biol*, 76:994–1001.
- Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG. 1990.** Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ Res*, 67(3):753-63.
- Conway EM. 2012.** Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol*, 34(1):107-25. Review.
- Conway EM, Rosenberg RD. 1988.** Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 8(12):5588-92.
- Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert J-M, Collen D, Theilmeier G. 2002.** The Lectin-like Domain of Thrombomodulin Confers Protection from Neutrophil-mediated Tissue Damage by Suppressing Adhesion Molecule Expression via Nuclear Factor κ B and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. *J Exp Med*, 196 (5): 565–577.
- Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. 1986.** The coronary circulation in human septic shock. *Circulation*, 73(4):637-44.
- Deitch EA. 1992.** Multiple Organ Failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 216(2):117-34.
- Deitch EA. 1998.** Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*, 9(1):1-11. Review.
- Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM. 2009.** Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 361(4):345-57.
- Dyson A, Singer M. 2009.** Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, 37(1 Suppl):S30-7. Review.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007.** Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-18.
- Esmon CT. 1987.** The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*, 235(4794):1348-52.
- Everds N. 2004.** Hematology of the Mouse. In: Hedrich HJ, Bullock G, Hrsg. *The Laboratory Mouse*. Academic Press, CHAPTER 17: 271-286, ISBN 9780123364258, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50070-4>.
- Faix JD. 2013.** Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50(1):23-36.
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. 2000.** Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*, 87(3):241-7.
- Fernandes CJ Jr, Akamine N, Knobel E. 1999.** Cardiac troponin: a new serum marker of myocardial injury in sepsis. *Intensive Care Med*, 25(10):1165-8.
- Fernandes CJ Jr, Akamine N, Knobel E. 2008a.** Myocardial depression in sepsis. *Shock*, 30 Suppl 1:14-7. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181818617. Review.
- Fernandes CJ Jr, Akamine N, Salomão R, Lisboa LF, Rigatto O. 2008b.** Troponin can discriminate the most severe septic patients and should be included as an early routine test in Surviving Sepsis Campaign patients. *Crit Care* 12 (Suppl 5): P13. doi: 10.1186/cc7046

- Fernandes CJ Jr, de Assuncao MS. 2012.** Myocardial dysfunction in sepsis: a large, unsolved puzzle. *Crit Care Res Pract*, 2012:896430. doi: 10.1155/2012/896430.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. 2007.** Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*, 449(7163):721-5.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA. 2008.** Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med*, 14(5-6):327-36. Review.
- Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W. 2000.** Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*, 404(6777):518-25.
- Gando S, Nakanishi Y, Kameue T, Nanzaki S. 1995.** Soluble thrombomodulin increases in patients with disseminated intravascular coagulation and in those with multiple organ dysfunction syndrome after trauma: role of neutrophil elastase. *J Trauma*, 39(4):660-4.
- Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, Schulz R. 2003.** Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*, 57(2):426-33.
- Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. 2009.** Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(7):465-79. doi: 10.1038/nri2569. Review.
- Geudens N, Van de Wouwer M, Vanaudenaerde BM, Vos R, Van De Wauwer C, Verleden GM, Verbeken E, Lerut T, Van Raemdonck DE, Conway EM. 2008.** The lectin-like domain of thrombomodulin protects against ischaemia-reperfusion lung injury. *Eur Respir J*, 32(4):862-70.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. 2011.** Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res. Sep*, 170(1): e123-34.
- Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. 2012.** Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol*, 95(4):333-45. Review.
- Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. 2015.** Activated protein C: biased for translation. *Blood*, 125(19):2898-907. Review.
- Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG. 1991.** Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res*, 25(1):80-8.
- Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. 1995.** Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock*, 4(4):269-73.
- Hare JM, Loh E, Creager MA, Colucci WS. 1995.** Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation*, 92(8):2198-203.
- Herzog C, Lorenz A, Gillmann HJ, Chowdhury A, Larmann J, Harendza T, Echtermeyer F, Müller M, Schmitz M, Stypmann J, Seidler DG, Damm M, Stehr SN, Koch T, Wollert KC, Conway EM, Theilmeier G. 2014.** Thrombomodulin's lectin-like domain reduces myocardial damage by interfering with HMGB1-mediated TLR2 signalling. *Cardiovasc Res*, 101(3):400-10.
- Hotchkiss RS, Rust RS, Dence CS, Wasserman TH, Song SK, Hwang DR, Karl IE, Welch MJ. 1991.** Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [18F]fluoromisonidazole. *Am J Physiol*, 261(4 Pt 2):R965-72.
- Ito T, Kakahana Y, Maruyama I. 2015.** Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 11:1-8.
- Iwase M, Yokota M, Kitaichi K, Wang L, Takagi K, Nagasaka T, Izawa H, Hasegawa T. 2001.** Cardiac functional and structural alterations induced by endotoxin in rats: importance of platelet-activating factor. *Crit Care Med*, 29(3):609-17.

- John J**, Woodward DB, Wang Y, Yan SB, Fisher D, Kinasewitz GT, Heiselman D. **2010**. Troponin-I as a prognosticator of mortality in severe sepsis patients. *J Crit Care*, 25:270–275.
- Jones AE, Puskarich MA. 2014**. The Surviving Sepsis Campaign guidelines 2012: update for emergency physicians. *Ann Emerg Med*, 63(1):35-47.
- Kager LM**, de Vos AF, Roelofs JJ, van der Loos CM, de Boer OJ, van't Veer C, Conway EM, van der Poll T. **2014a**. The thrombomodulin lectin-like domain does not change host responses to tuberculosis. *Thromb Haemost*, 111(2):345-53.
- Kager LM**, Wiersinga WJ, Roelofs JJ, Stroo I, Achouiti A, van 't Veer C, Conway EM, van der Poll T. **2014b**. Mice lacking the lectin-like domain of thrombomodulin are protected against melioidosis. *Crit Care Med*, 42(3):e221-30.
- Kapadia S**, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. **1995**. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*, 96(2):1042-52.
- Kass DA**, Beyar R, Lankford E, Heard M, Maughan WL, Sagawa K. **1989**. Influence of contractile state on curvilinearity of in situ end-systolic pressure-volume relations. *Circulation* 79 (1):167-178.
- Kim HK**, Kim JE, Chung J, Kim YT, Kang SH, Han KS, Cho HI. **2007**. Lipopolysaccharide down-regulates the thrombomodulin expression of peripheral blood monocytes: effect of serum on thrombomodulin expression in the THP-1 monocytic cell line. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 18(2):157-64.
- Knuefermann P**, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. **2002**. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 106(20):2608-15.
- Knuefermann P**, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. **2004a**. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation*, 110(24):3693-8.
- Knuefermann P**, Vallejo J, Mann DL. **2004b**. The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*, 14(1):1-7. Review.
- Kohr MJ**, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT. **2008**. Targeting of phospholamban by peroxynitrite decreases beta-adrenergic stimulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 77(2):353-61.
- Kohr MJ**, Davis JP, Ziolo MT. **2009**. Peroxynitrite Increases Protein Phosphatase Activity and Promotes the Interaction of Phospholamban with Protein Phosphatase 2a in the Myocardium. *Nitric Oxide*, 20(3):217-221.
- Kohr MJ**, Roof SR, Zweier JL, Ziolo MT. **2012**. Modulation of myocardial contraction by peroxynitrite. *Front Physiol*, 3:468. doi: 10.3389/fphys.2012.00468.
- Kojda G, Kottenberg K. 1999**. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res*, 41(3):514-23. Review.
- Krown KA**, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. **1995**. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients. *FEBS Lett*, 376(1-2):24-30.
- Kumar A**, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. **1996**. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*, 183(3):949-58.
- Kumar A**, Bunnell E, Lynn M, Anel R, Habet K, Neumann A, Parrillo JE. **2004**. Experimental human endotoxemia is associated with depression of load-independent contractility indices: prevention by the lipid analogue E5531. *Chest*, 126(3):860-7.

- Lan X**, Yin X, Wang R, Liu Y, Zhang Y. **2009**. Comparative study of cellular kinetics of reporter probe [(131)I]FIAU in neonatal cardiac myocytes after transfer of HSV1-tk reporter gene with two vectors. *Nucl Med Biol*, 36(2):207-13.
- Landesberg G**, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, Avidan A, Beerli R, Weissman C, Jaffe AS, Sprung CL. **2012**. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J*, 33(7):895-903.
- Layland J**, Li JM, Shah AM. **2002**. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*, 540(Pt 2):457-67.
- Lemm J**. **2015**. Zellkulturmodelle zur in-vitro-Charakterisierung der septischen Kardiomyopathie und Effekte des Gasotransmitters Schwefelwasserstoff bei systemischer Inflammation [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lew WY**, Yasuda S, Yuan T, Hammond HK. **1996**. Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, 28(6):1367-71.
- Li YH**, Chung HC, Luo CY, Chao TH, Shyu KG, Shi GY, Wu HL. **2010**. Thrombomodulin is upregulated in cardiomyocytes during cardiac hypertrophy and prevents the progression of contractile dysfunction. *J Card Fail*, 16(12):980-90.
- Liu S**, **Schreur KD**. **1995**. G protein-mediated suppression of L-type Ca^{2+} current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 268(2 Pt 1):C339-49.
- Lotze MT**, Tracey KJ. **2005**. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 5(4):331-42. Review.
- Louch WE**, Sheehan KA, Wolska BM. **2011**. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J Mol Cell Cardiol*. Author manuscript; available in PMC 2012 September 1. Published in final edited form as: *J Mol Cell Cardiol*, 51(3): 288–298.
- Ma CY**, Chang WE, Shi GY, Chang BY, Cheng SE, Shih YT, Wu HL. **2015**. Recombinant thrombomodulin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking the functions of CD14. *J Immunol*, 194(4):1905-15.
- Maass AH**, **Buoli M**. **2007**. Cardiomyocyte Preparation, Culture, and Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 366: Cardiac Gene Expression: Methods and Protocols: 321-330. doi: 10.1007/978-1-59745-030-0_18
- Macarthur H**, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. **2000**. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17):9753-8.
- MacLennan DH**, **Kranias EG**. **2003**. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7):566-77. Review.
- Maeder M**, Fehr T, Rickli H, Ammann P. **2006**. Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides. *Chest*, 129(5):1349-66. Review.
- Matsuda N**, Hattori Y, Akaishi Y, Suzuki Y, Kemmotsu O, Gando S. **2000**. Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits. *Anesthesiology*, 93(6):1465-73.
- Mehta NJ**, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. **2004**. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int J Cardiol*, 95:13–17.
- Meldrum DR**. **1998**. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*, 274(3 Pt 2):R577-95. Review.
- Merx MW**, **Weber C**. **2007**. Sepsis and the heart. *Circulation*, 116(7):793-802. Review.
- Miwa Y**, Yazaki S, Iwamoto M, Suzuki S, Iwasaki K, Haneda M, Yamamoto K, Maruyama S, Onishi A, Kobayashi T. **2015**. Functional difference between membrane-bound and soluble human thrombomodulin. *Transplantation*, 99(4):702-9.

- Moerer O, Quintel M. 2009.** Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects. *Internist (Berl)*, 50(7):788, 790-4, 796-8.
- Moore KL, Esmon CT, Esmon NL. 1989.** Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood*, 73(1):159-65.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19:683-765. Review.
- Müller-Werdan U. 1998.** Acute septic cardiomyopathy. *Internist (Berl)*, 39(5):467-78.
- Müller-Werdan U, Buerke M, Ebel H, Heinroth KM, Herklotz A, Loppnow H, Ruß M, Schlegel F, Schlitt A, Schmidt HB, Söffker G, Werdan K. 2006.** Septic cardiomyopathy – A not yet discovered cardiomyopathy? *Exp Clin Cardiol*, 11(3):226-236.
- Müller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, Werdan K. 1997.** [The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)]. *Wien Klin Wochenschr* 109 Suppl 1:3-24. Review.
- Müller-Werdan U, Werdan K. 2001.** Zytokine und Herzfunktion: Chronische Herzinsuffizienz und akute septische Kardiomyopathie. *Journal of Medical Science*, 7(70):854–863.
- Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, Yamada S, Miyauchi T, Higuchi K, Takenaka T, Yasuda T, Matsunaga A, Kakihana Y, Hashiguchi T, Kanmura Y, Maruyama I. 2013.** Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One*, 8(9):e75961.
- Ndongson-Dongmo B. 2015.** Phosphoinositide 3-kinase γ controls LPS-induced myocardial depression via sequential cAMP- and iNOS- signaling [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Neviere RR, Cepinskas G, Madorin WS, Hoque N, Karmazyn M, Sibbald WJ, Kviety PR. 1999.** LPS pretreatment ameliorates peritonitis-induced myocardial inflammation and dysfunction: role of myocytes. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 2):H885-92.
- Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, Zetoune FS, Su GL, Arbabi S, Sarma JV, Wang SC, Hemmila MR, Ward PA. 2006.** An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med*, 203(1):53-61.
- Nishimura T, Myles T, Piliponsky AM, Kao PN, Berry GJ, Leung LL. 2007.** Thrombin-activatable procarboxypeptidase B regulates activated complement C5a in vivo. *Blood*, 109(5):1992-7. Erratum in: *Blood*. 2007, 109(9):3632. Piliposky, Adrian M [corrected to Piliponsky, Adrian M].
- Ohlin AK, Larsson K, Hansson M. 2005.** Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J Thromb Haemost*, 3(5):976-82.
- Opie LH. 2004.** Receptors and signal transduction. In: Opie LH, Hrsg. *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. Fourth Edition. London, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, pp 186–220.
- Oral H, Dorn GW 2nd, Mann DL. 1997.** Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem*, 272(8):4836-42.
- Orwoll BE, Spicer AC, Zinter MS, Alkhoul MF, Khemani RG, Flori HR, Neuhaus JM, Calfee CS, Matthay MA, Sapru A. 2015.** Elevated soluble thrombomodulin is associated with organ failure and mortality in children with acute respiratory distress syndrome (ARDS): a prospective observational cohort study. *Crit Care*, 19(1):435.
- Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. 2006.** Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol*, 177(3):1967-74.
- Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. 2008.** Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*, 3(9):1422-1434.

- Parrillo JE. 1989.** The cardiovascular pathophysiology in sepsis. *Annu Rev Med*, 40: 469-85.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. 2004.** Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 279(9):7370-7.
- Parker MM, Shelhamer JH, Bacharch SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. 1984.** Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*, 100(4):483-90.
- Parker MM, Shelhamer JH; Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. 1987.** Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med*, 15(10):923-9.
- Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. 1990.** Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest*, 97(1):126-31.
- Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.
- Phillips DP, Kaynar AM. 2012.** Septic cardiomyopathy. *Int Anesthesiol Clin*, 50(3):187-201.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M. 2013.** Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int*, 33(2):283-93.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T; German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine; German Sepsis Society. 2010.** Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI). *Anaesthesist*, 59 (4):347-70.
- Remick DG, Ward PA. 2005.** Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*, 24 Suppl 1:7-11. Review.
- Rork TH, Hadzimichalis NM, Kappil MA, Merrill GF. 2006.** Acetaminophen attenuates peroxynitrite-activated matrix metalloproteinase-2-mediated troponin I cleavage in the isolated guinea pig myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 40(4):553-61.
- Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP. 2007.** Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock*, 27(1):10-8.
- Rozanski GJ, Witt RC. 1994.** IL-1 inhibits beta-adrenergic control of cardiac calcium current: role of L-arginine/nitric oxide pathway. *Am J Physiol*, 267(5 Pt 2):H1753-8.
- Rudiger A, Dyson A, Felsmann K, Carré JE, Taylor V, Hughes S, Clatworthy I, Protti A, Pellerin D, Lemm J, Claus RA, Bauer M, Singer M. 2013.** Early functional and transcriptomic changes in the myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 124(6):391-401.
- Rudiger A, Singer M. 2007.** Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 35(6):1599-608.
- Rudiger A, Singer M. 2013.** The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. *Curr Vasc Pharmacol*, 11(2):187-95. Review.
- Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R, Hirayama A, Matsuda T, Asakura H, Nakashima M, Aoki N. 2007.** Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost*, 5(1):31-41.

- Sande JB**, Sjaastad I, Hoen IB, Bøkenes J, Tønnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G. **2002**. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res*, 53(2):382-91.
- Schuster HP**. **1989**. VI Schlussfolgerungen. In: Werdan K, Schuster HP, Schlag G, Spilker G, Neumann R (Hrsg). Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. *Intensivmed* 26 (Suppl 1):152-3.
- Schwinger RH**, Münch G, Bölck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. **1999**. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 31(3):479-91.
- Sha Y**, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. **2008**. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol*, 180:2531–2537.
- Shi CS**, Shi GY, Hsiao HM, Kao YC, Kuo KL, Ma CY, Kuo CH, Chang BI, Chang CF, Lin CH, Wong CH, Wu HL. **2008**. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood*, 112(9):3661-70. Erratum in: *Blood*. 2013, 121(10):1924. Hsiao, Shi-Ming [corrected to Hsiao, Hsi-Min].
- Sohn RH**, Deming CB, Johns DC, Champion HC, Bian C, Gardner K, Rade JJ. **2005**. Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B. *Blood*, 105(10):3910-7.
- Soriano FG**, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Teixeira AC, Cappi SB, Lotufo PA, Bernik MM, Zsengellér Z, Chen M, Szabó C. **2006**. Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med*, 34(4):1073-9.
- Sung MM**, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-López NL, Schulz R. **2007**. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*, 43(4):429-36.
- Suzuki K**, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, Maruyama I, Zushi M, Kawahara S, Honda G, Yamamoto S, Horiguchi S. **1987**. Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J*, 6(7):1891-7.
- Tang C**, Liu MS. **1996**. Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2):R254-63.
- Tao W**, Deyo DJ, Traber DL, Johnston WE, Sherwood ER. **2004**. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. *Shock*, 21(1):31-7.
- Tashiro H**, Aoki M, Isobe M, Hashiya N, Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. **2005**. Development of novel method of non-viral efficient gene transfer into neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 39(3):503-9.
- Terentyev D**, Viatchenko-Karpinski S, Gyorke I, Terentyeva R, Gyorke S. **2003**. Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol*, 552(Pt 1):109-18.
- Thomas L**. **1972**. Germs. *N Engl J Med*, 287(11):553-5.
- Tzeng HP**, Fan J, Vallejo JG, Dong JW, Chen X, Houser SR, Mann DL. **2008**. Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(3):H1490-6.
- Uehara S**, Gotoh K, Handa H. **2001**. Separation and characterization of the molecular species of thrombomodulin in the plasma of diabetic patients. *Thromb Res*, 104(5):325-32.
- Van de Wouwer M**, Conway EM. **2004**. Novel functions of thrombomodulin in inflammation. *Crit Care Med*, 32(5 Suppl):S254-61. Review.

- Van de Wouwer M**, Collen D, Conway EM. **2004**. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8): 1374-83.
- Van de Wouwer M**, Plaisance S, De Vriese A, Waelkens E, Collen D, Persson J, Daha MR, Conway EM. **2006**. The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost*, 4(8):1813-24.
- ver Elst KM**, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. **2000**. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem*, 46(5):650-7.
- Verheugt FW**, von dem Borne AE, Décarry F, Engelfriet CP. **1977**. The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol*, 36(4):533-44.
- Viellard-Baron A**, Slama M, Cholley B, Janvier G, Vignon P. **2008**. Echocardiography in the intensive care unit: from evolution to revolution? *Intensive Care Med*, 34(2):243-9.
- Vincent JL**, Ramesh MK, Ernest D, LaRosa SP, Pacht J, Aikawa N, Hoste E, Levy H, Hirman J, Levi M, Daga M, Kutsogiannis DJ, Crowther M, Bernard GR, Devriendt J, Puigserver JV, Blanzaco DU, Esmon CT, Parrillo JE, Guzzi L, Henderson SJ, Pothirat C, Mehta P, Fareed J, Talwar D, Tsuruta K, Gorelick KJ, Osawa Y, Kaul I. **2013**. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*, 41(9):2069-79.
- Waisbren BA**. **1951**. Bacteremia due to gram-negative bacilli other than the Salmonella; a clinical and therapeutic study. *AMA Arch Intern Med*, 88(4):467-88.
- Wang H, Ma S**. **2008**. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med*, 26(6):711-5.
- Wang W**, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. **2002a**. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*, 106(12):1543-9.
- Wang W**, Sawicki G, Schulz R. **2002b**. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res*, 53(1):165-74.
- Werdan K**, Oelke A, Müller-Werdan U. **2009**. „Myocardial Depression“ or „Septic cardiomyopathy“? In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. 183-194. Edited by J.-L. Vincent. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Wiedermann CJ**, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, Strauss R, Keinecke HO, Warren BL, Opal SM; KyberSept Investigators. **2006**. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med*, 34(2):285-92.
- Wu AHB**. **2001**. Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med*, 27:959–961.
- Wu LL**, Tang C, Dong LW, Liu MS. **2002**. Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. *Shock*, 17(5):389-93.
- Wu LL**, Yang SL, Yang RC, Hsu HK, Hsu C, Dong LW, Liu MS. **2003**. G protein and adenylylate cyclase complex-mediated signal transduction in the rat heart during sepsis. *Shock*, 19(6):533-7.
- Xu J**, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. **2009**. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*, 15(11):1318-21.
- Xu H**, Su Z, Wu J, Yang M, Penninger JM, Martin CM, Kvietys PR, Rui T. **2010**. The alarmin cytokine, high mobility group box 1, is produced by viable cardiomyocytes and mediates

- the lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction via a TLR4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway. *J Immunol*, 184(3):1492-8.
- Yamakawa K**, Ogura H, Fujimi S, Morikawa M, Ogawa Y, Mohri T, Nakamori Y, Inoue Y, Kuwagata Y, Tanaka H, Hamasaki T, Shimazu T. **2013**. Recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. *Intensive Care Med*, 39(4):644-52.
- Yamakawa K**, Aihara M, Ogura H, Yuhara H, Hamasaki T, Shimazu T. **2015**. Recombinant human soluble thrombomodulin in severe sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*, 13(4):508-19.
- Yang H**, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. **2005**. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*, 78(1):1-8. Review.
- Yasuda S**, Lew WY. **1997**. Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and beta-adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca²⁺ in cardiac myocytes. *Circ Res*, 81(6):1011-20.
- Yin K**, Gribbin E, Wang H. **2005**. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of High Mobility Group Box-1. *Shock*, 24:396-401.
- Yoshimura J**, Yamakawa K, Ogura H, Umemura Y, Takahashi H, Morikawa M, Inoue Y, Fujimi S, Tanaka H, Hamasaki T, Shimazu T. **2015**. Benefit profile of recombinant human soluble thrombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis. *Crit. Care*, 19:78.
- Zaky A**, Deem S, Bendjelid K, Treggiari MM. **2014**. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. *Shock*, 41(1):12-24. Review.
- Zhao P**, Wang Y, Zeng S, Lu J, Jiang TM, Li YM. **2015**. Protective effect of astragaloside IV on lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via downregulation of inflammatory signaling in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 37(5):428-33.
- Zhu S**, Li W, Ward MF, Sama AE, Wang H. **2010**. High mobility group box 1 protein as a potential drug target for infection- and injury-elicited inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 9(1):60-72. Review.
- Ziolo MT**, Harshbarger CH, Roycroft KE, Smith JM, Romano FD, Sondgeroth KL, Wahler GM. **2001a**. Myocytes isolated from rejecting transplanted rat hearts exhibit a nitric oxide-mediated reduction in the calcium current. *J Mol Cell Cardiol*, 33(9):1691-9.
- Ziolo MT**, Katoh H, Bers DM. **2001b**. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses beta-adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. *Circulation*, 104(24):2961-6.
- Ziolo MT**, Kohr MJ, Wang H. **2008**. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol*, 45(5):625-32.
- Zoja C**, Locatelli M, Pagani C, Corna D, Zanchi C, Isermann B, Remuzzi G, Conway EM, Noris M. **2012**. Lack of the lectin-like domain of thrombomodulin worsens Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in mice. *J Immunol*, 189(7):3661-8.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur und Funktion von Thrombomodulin	20
Abbildung 2:	Überlebensanalyse nach polymikrobieller Sepsis (1 300 KbE Gram-positive + 6 400 KbE Gram-negative pro g KG i.p.)	44
Abbildung 3:	Bewertung der Krankheitsschwere anhand des CSS zu indizierten Zeitpunkten nach polymikrobieller Sepsis (2 µL/g KG Faeces i.p.)	46
Abbildung 4:	Myokardiale Kontraktilität nach 12 h PCI	50
Abbildung 5:	Systolische und diastolische Funktionsparameter in scheinbehandelten Tieren und 12 h nach Sepsisinduktion.	51
Abbildung 6:	Apoptose im Myokard nach PCI	53
Abbildung 7:	Infiltration des Myokards durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten nach PCI	54
Abbildung 8:	Zirkulierende inflammatorische Proteine nach polymikrobieller Sepsis	55
Abbildung 9:	Zeitabhängige Veränderungen von zirkulierendem HMGB1 und kardialen Troponin I	56
Abbildung 10:	Positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von HMGB1 und kardialen Troponin im Plasma nach polymikrobieller Sepsis	56
Abbildung 11:	Zeitabhängige mRNA-Expressionsänderungen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	57
Abbildung 12:	mRNA-Expression von IL-10 im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	58
Abbildung 13:	Zytokinfreisetzung im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	58
Abbildung 14:	Gesteigerte Expression von TLR2 und TLR4 im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	59
Abbildung 15:	mRNA-Expression von TLR-aktivierten Transkriptionsfaktoren im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	60
Abbildung 16:	mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen in Kardiomyozyten nach 6-stündiger Stimulation mit Zytokinmix	61
Abbildung 17:	MCP-1 Freisetzung durch adulte Kardiomyozyten nach Stimulation mit LPS und/oder HMGB1	62
Abbildung 18:	Phospho-Phospholamban Konzentrationen im Myokard nach polymikrobieller Sepsis	63
Abbildung 19:	mRNA-Expressionsänderungen von iNOS und MMP9 im Myokard 6, 12 und 24 h nach PCI	64
Abbildung 20:	Proteinquantifizierung und mRNA-Expression nach Überexpression von Thrombomodulin in neonatalen Kardiomyozyten	66
Abbildung 21:	mRNA-Expression nach siRNA vermittelter Degradierung von TLR2 und TLR4 in neonatalen Kardiomyozyten	66
Abbildung 22:	mRNA-Expression von Zytokinen nach Transfektion mit hTM oder hTM-ΔLLD bei gleichzeitiger siRNA-vermittelter Degradierung der Rezeptoren TLR2 oder TLR4	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Definition von <i>Systemic Inflammatory Host Response Syndrome</i> (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischen Schock	11
Tabelle 2:	Bewertungsgrundlage zur Erhebung des <i>Clinical Severity Score</i> (CSS)	28
Tabelle 3:	Bezeichnung und Bestellinformation der verwendeten Fuji-DriChem-Slides	29
Tabelle 4:	Verwendete Substanzen zur Stimulation von neonatalen Kardiomyozyten	34
Tabelle 5:	Verwendeten Reagenzien zur Transfektion von neonatalen Kardiomyozyten	35
Tabelle 6:	Antisense-Oligonukleotidsequenz der verwendeten siRNA für Transfektion	35
Tabelle 7:	Oligoname, Sequenz (5'-3') und cDNA-Evidenzgrundlage der verwendeten Primer für qRT-PCR	37
Tabelle 8:	Bezeichnung, Firma, Bestellinformation und Applikation der verwendeten Antikörper	40
Tabelle 9:	Geschlechtsspezifische Gruppenvergleiche der Überlebensdynamik nach PCI anhand des Log-Rank (Mantel-Cox)	45
Tabelle 10:	Parameter der Physiologie, Hämatologie und klinischen Chemie nach 6, 12 und 24 Stunden polymikrobieller Sepsis.	48

Danksagung

Vornehmlich gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Stehr für die Überlassung des Themas sowie die fortwährende Betreuung, Unterstützung und hilfreiche Korrekturvorschläge während der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit, auch über die spätere geographische Distanz hinweg. Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Regine Heller und Prof. Dr. med. Reinhard Bauer für die Ratschläge bezüglich des experimentellen Designs und die darüber hinausgehende wissenschaftliche Betreuung.

Diese Arbeit wäre ohne die Finanzierung durch das CSCC nicht entstanden, weshalb ich mich für diese Möglichkeit bedanke.

Weiterhin gebührt mein besonderer Dank Dr. rer. nat. Bernadin Ndongson Dongmo, sowohl für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der intrakardialen Konduktanzkather-Messungen und für die Isolation der adulten murinen Kardiomyozyten, als auch für die zahlreichen anregenden Gespräche und dem wissenschaftlichen Austausch bezüglich des gemeinsamen Arbeitsthemas der septischen Kardiomyopathie von Beginn an.

Ich danke weiterhin dem gesamten Team der experimentellen Anästhesie sowohl für die praktische Unterstützung bei der Durchführung und Aufarbeitung der Experimente, als auch für die zahlreichen anregenden Gespräche zum wissenschaftlichen Kontext meiner Arbeit. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Ulrike Vetterling, Frau Brigitte Specht und Frau Edith Walther für die technische Assistenz, vornehmlich die histologischen Verfahren betreffend. Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Kollegen Frau Dr. rer. nat. Jana Lemm, Frau M. Sc. Luisa Ungelenk, Frau M. Sc. Franziska Schleser und Herrn M. Sc. Adrian Press, die mir neben den zahlreichen wissenschaftlichen Gesprächen und Vorschlägen auch stets eine zuverlässige Stütze im Laboralltag waren.

Abschließend danke ich von ganzem Herzen meiner Tochter Elissa für ihre entgegengebrachte Unterstützung, das fortwährende Vertrauen in meine Fähigkeiten und die überdurchschnittliche Motivation, ohne deren Verständnis und Geduld - auch in schwierigen Zeiten - all das nicht möglich gewesen wäre.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Effekte der lektinartigen Domäne des Thrombomodulin in der murinen polymikrobiellen septischen Kardiomyopathie“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle entsprechend den Empfehlungen zur Zitierweise in Dissertationsschriften des Dekanats der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 1. November 2003 kenntlich gemacht.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Prof. Dr. med. Sebastian Stehr, Prof. Dr. med. Regine Heller, Prof. Dr. med. Reinhard Bauer. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte erhielten weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit ist noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung vorgelegt worden.

Mir ist die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt und ich habe die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und prüfungsrechtlichen Folgen (§ 5 (1) Ziffer 3, § 8 (5) bzw. § 16 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 3. Juni 2009) sowie die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung (§ 156 StGB) zur Kenntnis genommen.

Jena, den 28.01.2016

Ort, Datum

Unterschrift